



Universidad de Málaga
Facultad de Medicina
Dpto. de Histología y Anatomía Patológica

Tesis Doctoral

**MARCADORES PATOBIOLÓGICOS Y
SUPERVIVENCIA EN EL CÁNCER COLO-RECTAL.
ESTUDIO MOLECULAR Y TOPOGRÁFICO DE LA
BETA-CATENINA, P53 Y PROTEÍNAS
REPARADORAS.**

Juan Daniel Prieto Cuadra

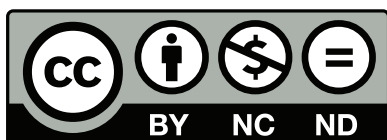
Málaga, 2013



SPICUM
servicio de publicaciones

AUTOR: Juan Daniel Prieto Cuadra

EDITA: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



Dpto. de Histología y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

Dra. Martina Álvarez Pérez, Prof. Asociado de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

Dra. M^a Isabel Hierro Martín, Jefe de Sección y Directora de la Unidad de la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga.

Prof. Dr. D. Alfredo Matilla Vicente, Catedrático y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina/Hospital Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga

CERTIFICAN:

Que D. **Juan Daniel PRIETO CUADRA**, ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral "**MARCADORES PATOBIOLÓGICOS Y SUPERVIVENCIA EN EL CÁNCER COLO-RECTAL. ESTUDIO MOLECULAR Y TOPOGRÁFICO DE LA BETA-CATENINA, P53 Y PROTEÍNAS REPARADORAS**", que ha sido concluido con todo aprovechamiento, habiendo los que suscriben revisado esta Tesis y estando conformes con su presentación para ser juzgada.

Dra. Martina Álvarez

Dra. M^a Isabel Hierro

Prof. Dr. D. Alfredo Matilla

A mi esposa, Almudena

A mi maestra, Martina

En principio, la investigación necesita más cabezas que medios.

Severo Ochoa de Albornoz (1905 – 1993)

AGRADECIMIENTOS

En el largo camino recorrido hasta finalizar esta tesis, he tenido la inmensa suerte de contar con la ayuda y apoyo de numerosas personas, para las que me es difícil encontrar palabras que expresen mi nivel de gratitud, y que cito a continuación.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral; al Dr. Alfredo Matilla, por su capacidad de vislumbrar objetivos, reorganizar medios para conseguirlos, minimizar costes y desarrollar el potencial de los resultados, así como por su inestimable colaboración en la valoración microscópica de los casos; a la Dra. Isabel Hierro, por su orientación científica y espíritu crítico; y a la Dr. Martina Álvarez, ya que su ayuda, enfoque científico, estímulo constante y paciencia infinita han resultado completamente indispensables para la consecución de este trabajo.

Gracias a mis compañeros del Hospital Virgen de la Victoria; al Dr. Luis Vicioso por brindarme su tiempo y la experiencia propia de su tesis doctoral, al Dr. Juan Jiménez por dedicarme tiempo y útiles consejos y, en definitiva, a todas aquellas personas que han compartido conmigo este esfuerzo.

Gracias a Isabel García, ya que hemos compartido “como hermanos” todo el proyecto hasta su finalización, y sin su apoyo moral y carisma no hubiera sido posible.

A los pacientes, de los que nace y a los que va destinado este trabajo, que con su consentimiento desinteresado nos permiten seguir investigando sus enfermedades.

Gracias a Vanesa, José Antonio y María José por su trabajo en la construcción de matrices y realización de técnicas de inmunohistoquímica.

Gracias a todos aquellos que están cerca de mí, y en especial a mi esposa Almudena, que ha sabido comprender y soportarme en todos los momentos del proyecto, brindándome siempre su apoyo y sin perder la sonrisa.

Y gracias a mis padres, por su apoyo incondicional, y por su constancia y esfuerzo en mi educación.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

| | | | |
|---------------|---|-------------------|--------------------|
| CCR | Carcinoma colo-rectal | β-catenina | Beta-catenina |
| CCRs | Carcinomas colo-rectales | MMR | “mismatch repair” |
| PAC | Porcentaje anual de cambio | IHQ | Inmunohistoquímica |
| OMS | Organización Mundial de la Salud | | |
| IMS | Inestabilidad de microsatélites | | |
| MSI-A | Alta inestabilidad de microsatélites | | |
| MSI-B | Baja inestabilidad de microsatélites | | |
| EMS | Estabilidad de microsatélites | | |
| CIN | Inestabilidad cromósomica | | |
| FIX | “fixed” | | |
| FLO | “floating” | | |
| AJCC | “American Journal Cancer Committee” | | |
| UICC | Unión Internacional Contra el Cáncer | | |
| CAP | “College American of Pathologist” | | |
| APC | Poliposis Adenomatosa Colónica | | |
| TNM | Clasificación de los estadios tumorales | | |
| Tcf | Factor de células T | | |
| LRP | “low density lipoprotein receptor-related protein family” | | |
| Frz | “Frizzled receptor” | | |
| Dsh | “Dishevelled” | | |
| TMA/MT | “Tissue microarrays”/Matrices de tejido | | |
| PCR | Reacción en cadena de la Polimeras | | |

| | |
|---|----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER COLO-RECTAL (CCR) | 2 |
| 1.1 Distribución geográfica y racial | 2 |
| 1.2 Sexo | 4 |
| 1.3 Edad | 8 |
| 2. HISTORIA NATURAL | 9 |
| 2.1 Factores etiológicos | 9 |
| 2.2 Morfopatología | 10 |
| - Localización | 10 |
| - Tamaño tumoral | 12 |
| - Tipo histológico | 12 |
| - Grado de diferenciación cito-histológico | 15 |
| - Carácter del patrón infiltrante | 17 |
| - Invasión vascular | 17 |
| - Respuesta celular peritumoral | 17 |
| 2.3 Evolución | 18 |
| - Diseminación loco-regional | 18 |
| - Metástasis | 19 |
| - Extensión del tumor: clasificación TNM. | 20 |
| Estadios patológicos | 21 |
| - Recidiva local | 22 |
| - Causa de muerte | 23 |
| 3. VÍAS MOLECULARES IMPLICADAS EN EL CCR | 25 |
| 3.1 Carcinogénesis colo-rectal | 25 |
| 3.2 Clasificación molecular del CCR | 29 |
| 3.3 Importancia de la vía Wnt en el CCR | 31 |
| - β -catenina: el oncogén central de la vía Wnt. | 33 |
| - Iniciación del CCR: implicaciones de la vía Wnt. | |
| Papel de la B-catenina. | 35 |
| - Progresión del CCR: importancia de la β -catenina | 39 |
| 3.4 Interacción de la β -catenina con otras vías moleculares | 41 |
| - Relación entre β -catenina y la expresión de p53 | 44 |
| - Relación entre β -catenina y la inestabilidad de microsatélites | 49 |
| 4. UTILIDAD DE MATRICES DE TEJIDO (MT) PARA LA VALORACIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS EN EL CCR | 51 |

| | |
|---|------------|
| II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA | 54 |
| III. MATERIAL Y MÉTODO | 57 |
| A. POBLACIÓN DE ESTUDIO | 59 |
| B. MÉTODOS | 59 |
| 1. Realización de matrices de tejido | 59 |
| 2. Marcadores inmunohistoquímicos | 60 |
| 3. Valoración e interpretación de la inmunotinción | 61 |
| 4. Conveniencia del método | 61 |
| C. VARIABLES ESTUDIADAS | 61 |
| 1. Variables clínico – patológicas | 61 |
| 2. Variables histo – patológicas | 62 |
| 3. Variables inmunohistoquímicas | 68 |
| D. ESTUDIO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS | 74 |
| IV. RESULTADOS | 75 |
| ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA | 76 |
| 1. Variables clínico – patológicas | 76 |
| 2. Variables histo – patológicas | 77 |
| 3. Variables inmunohistoquímicas | 82 |
| 4. Supervivencia | 86 |
| ESTADÍSTICA ANALÍTICA | 87 |
| A. Correlación entre las variables clínico-patológicas y la β -catenina | 87 |
| B. Correlación entre las variables clínico-patológicas y la β -catenina | 89 |
| C. Correlación entre las variables inmunohistoquímicas y la β -catenina | 98 |
| D. Correlación entre otras variables | 104 |
| E. Estudio de supervivencia | 107 |
| V. DISCUSIÓN | 144 |
| VI. CONCLUSIONES | 160 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 162 |

I. INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CARCINOMA COLO-RECTAL

1.1. Distribución geográfica y racial

El cáncer colo-rectal (CCR) constituye el tercer cáncer más prevalente a nivel mundial (después del de pulmón y el de mama). La incidencia y mortalidad de carcinoma de intestino grueso muestra una amplia variación según la zona geográfica considerada y el grado de desarrollo de los países. Así, casi el 60% de los casos se diagnostican en países desarrollados; Norteamérica y América central, norte de Europa, Australia y Nueva Zelanda, siendo la segunda neoplasia más común excluyendo las de piel. Mientras tanto, en países subdesarrollados de África y Asia su aparición es poco usual (llegando a ser la incidencia la mitad). Poblaciones como Japón e Israel también presentan una baja tasa de carcinomas de colon y recto. En estudios sobre población americana, la raza blanca o caucásica parece tener una mayor propensión que la negra para padecer este tipo de neoplasia.

El CCR constituye la segunda causa de muerte por cáncer. Se considera que la posibilidad de que un individuo con riesgo promedio padezca CCR durante su vida es del 6%. En la Unión Europea, la incidencia y mortalidad del CCR es de 58/100.000 hab. y 30/100.000 hab. por año, respectivamente (1). En el año 2008, aproximadamente 1,23 millones de nuevos casos fueron diagnosticados, representando el 9,7% de todos los nuevos cánceres y se registraron 609.000 muertes (la mitad de la incidencia) en todo el mundo (2,3).

Los últimos datos publicados muestran que en España, en el año 2008, se diagnosticaron 28.551 nuevos casos de CCR y 14.303 fallecieron por este cáncer, representando una tasa estandarizada por edad de 30,4 y 13,3 por 100.000 respectivamente (tabla 1) (2).

Tabla 1. Incidencia estimada, mortalidad y prevalencia a 5 años para ambos sexos en España (2)

| Cancer | Incidence | | | Mortality | | | 5-year prevalence | | |
|------------------|-----------|------|---------|-----------|------|---------|-------------------|------|-------|
| | Number | (%) | ASR (W) | Number | (%) | ASR (W) | Number | (%) | Prop. |
| Lip, oral cavity | 5167 | 2.6 | 6.7 | 1234 | 1.2 | 1.5 | 14926 | 2.8 | 39.3 |
| Nasopharynx | 445 | 0.2 | 0.7 | 206 | 0.2 | 0.3 | 1153 | 0.2 | 3.0 |
| Other pharynx | 1773 | 0.9 | 2.7 | 889 | 0.9 | 1.3 | 4393 | 0.8 | 11.6 |
| Oesophagus | 2118 | 1.1 | 2.8 | 1872 | 1.8 | 2.3 | 2269 | 0.4 | 6.0 |
| Stomach | 7792 | 4.0 | 8.4 | 5978 | 5.7 | 6.0 | 12584 | 2.4 | 33.2 |
| Colorectum | 28551 | 14.5 | 30.4 | 14303 | 13.7 | 13.3 | 79436 | 15.0 | 209.4 |
| Liver | 5095 | 2.6 | 5.8 | 4631 | 4.4 | 4.6 | 5078 | 1.0 | 13.4 |
| Gallbladder | 2001 | 1.0 | 1.8 | 1355 | 1.3 | 1.2 | 1902 | 0.4 | 5.0 |
| Pancreas | 5084 | 2.6 | 5.5 | 5043 | 4.8 | 5.3 | 2747 | 0.5 | 7.2 |
| Larynx | 3401 | 1.7 | 4.7 | 1705 | 1.6 | 2.1 | 11965 | 2.3 | 31.5 |
| Lung | 23211 | 11.8 | 28.8 | 20327 | 19.5 | 23.8 | 24404 | 4.6 | 64.3 |
| Melanoma of skin | 3602 | 1.8 | 5.2 | 834 | 0.8 | 1.0 | 14237 | 2.7 | 37.5 |
| Breast | 22027 | 11.2 | 61.0 | 6008 | 5.8 | 12.9 | 91039 | 17.2 | 469.7 |
| Cervix uteri | 1948 | 1.0 | 6.3 | 712 | 0.7 | 1.9 | 6879 | 1.3 | 35.5 |
| Corpus uteri | 4385 | 2.2 | 10.9 | 1173 | 1.1 | 2.0 | 16502 | 3.1 | 85.1 |

La predicción para 2015 es un incremento en los siguientes valores: 32.197 nuevos casos y 16.104 muertes (2). El conocimiento de la incidencia, la mortalidad y tendencias de la prevalencia es útil para predecir el número de casos incidentes y muertes en el futuro y predecir las necesidades de las instalaciones de tratamiento (4).

Cayuela et al. (5) analizaron los cambios en las tendencias de mortalidad por CCR en Andalucía durante el periodo 1980-2008, usando modelos de regresión de “*jointpoint*” los cuales permiten identificar puntos (años) con cambios significativos en la tendencia temporal y estimar la magnitud de dichos cambios.

Los datos actuales, no sólo en Andalucía sino en toda España, constatan la necesidad de incorporar de manera urgente medidas para mejorar la situación, teniendo en cuenta tanto el proceso acelerado de envejecimiento de la población como las estimaciones realizadas en cuanto al aumento de las tasas de incidencia. En este contexto, será también muy importante poder determinar los factores que influyen en su pronóstico, especialmente en los pacientes que han sido operados con intención curativa.

1.2. Sexo

La ratio de cáncer rectal es una 50% más alto en hombres que en mujeres, mientras que la ratio del CCR es tan solo un 20% mayor en hombres que en mujeres (3).

Durante las últimas dos décadas, la incidencia de cáncer colorrectal entre hombres y mujeres ha mostrado un marcado aumento en España y otros países europeos. En España, el cáncer colorrectal es actualmente el tercer tipo más común de cáncer en los hombres, con tasas ajustadas por edad de acuerdo con la población mundial estándar de aproximadamente 39,7 y 18 casos por 100.000 habitantes / año para la incidencia y la mortalidad, respectivamente. En las mujeres, este tipo de cáncer ocupa la segunda posición, con tasas de incidencia y mortalidad de 23 y 9,5 casos por 100.000 habitantes / año, respectivamente (2). La incidencia en España es comparable a la encontrada en zonas de alto riesgo de Europa Occidental, América del Norte, Australia y Japón (6).

Los datos publicados de la incidencia de cáncer en cinco continentes revelan que existe un aumento en la incidencia de los hombres en los países europeos, excepto en Francia, donde en un primer momento hubo un aumento, pero luego una disminución en las cifras, lo mismo ocurre en EE.UU. y Japón. En Canadá y en la India las cifras son estables. Ha aumentado también la incidencia en mujeres de la mayor parte de Europa. En Canadá, Dinamarca y Japón se registró un aumento y luego una disminución de las tasas para las mujeres, y en la India, las tasas son estables. Aunque hay avances tecnológicos en el tratamiento de cáncer colorrectal, la mortalidad sigue aumentando en los países en desarrollo (7).

En España, la mortalidad en los últimos años (periodo 1985-2004), ha ido aumentando con un porcentaje anual de cambio (PAC) del 2,4% en hombres y 0,4% en mujeres, observando una tendencia a la estabilización en los últimos años (8,9). Esta mayor mortalidad coincide con un aumento significativo de la incidencia en ambos sexos, probablemente debido a la mejora en el acceso de las técnicas de diagnóstico y a la occidentalización en algunos factores de riesgo del CCR como la dieta y la obesidad. Desde los años 90, se ha experimentado una mejora en la supervivencia relativa a los 5 años en ambos sexos pudiéndose explicar por un diagnóstico precoz en estadios más iniciales, un avance en el tratamiento principalmente para los estadios II y III, y también a una disminución en la mortalidad postoperatoria. Las estimaciones realizadas para los próximos años por Ribes et al (9) muestran un patrón similar al actual, con un aumento de la mortalidad en hombres y una estabilización en mujeres.

En España, 1 de cada 7 muertes relacionadas con cáncer en el 2008 se debió a la neoplasia colorrectal, por lo que es el segundo cáncer de liderazgo entre hombres (después del cáncer de pulmón) y mujeres (después del cáncer de mama), que representa un total de 14303 muertes.

La mortalidad por cáncer colorrectal fue menor en las mujeres que en los hombres. Mientras que entre las mujeres se redujo a partir de 2000, en los hombres se estabilizó (fig. 3) (10). La reducción de la mortalidad se espera que sea más pronunciada entre las mujeres que entre los hombres. En 2012 hubo una incidencia y una mortalidad de aproximadamente 34000 y 13200 casos (respectivamente) de cáncer colo-rectal en España en ambos sexos (tabla 2) (10).

Figura 3. Mortalidad e incidencia (líneas continuas azul y roja) para 1981-2012 del CCR en España. Ratio estandarizado por edad de hombres y mujeres (población europea) por 100000 personas/año, en edad de 0-94 años (10)

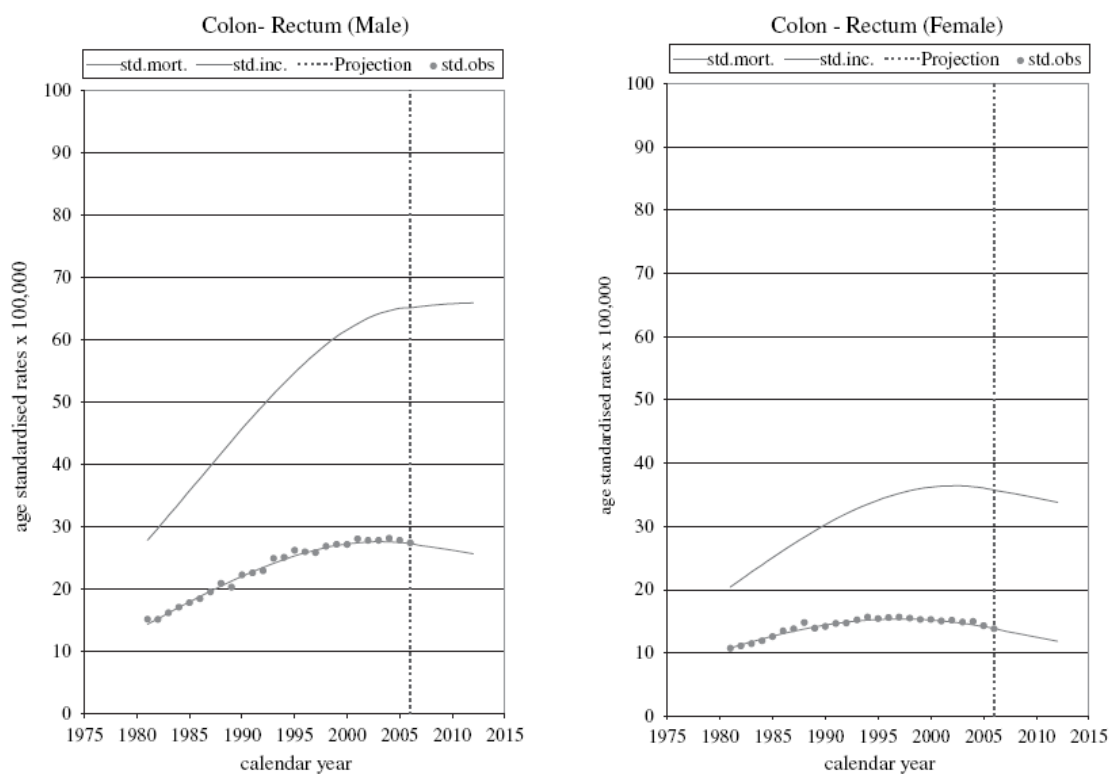


Tabla 2. Mortalidad e incidencia de cáncer en España para 2006 y 2012, por localización y sexo: número de casos, brutos y ratio estandarizado por edad europeo (ASR-E) por 100.000 personas – años; edad 0 – 94 años (10).

| | Men | | | Women | | |
|-------------------------|--------------|-------------|-------|--------------|-------------|-------|
| | No. of cases | Crude rates | ASR-E | No. of cases | Crude rates | ASR-E |
| Mortality | | | | | | |
| Year 2006 | | | | | | |
| Stomach | 3568 | 17 | 13 | 2118 | 10 | 6 |
| Colorectal | 7547 | 35 | 27 | 5330 | 24 | 14 |
| Lung | 16 612 | 77 | 65 | 2671 | 12 | 9 |
| Breast | — | — | — | 5923 | 27 | 19 |
| Prostate | 5501 | 25 | 19 | — | — | — |
| All cancer ^a | 61 354 | 285 | 232 | 37 419 | 169 | 106 |
| Year 2012 | | | | | | |
| Stomach | 3303 | 15 | 11 | 1899 | 8 | 5 |
| Colorectal | 8070 | 37 | 26 | 5134 | 23 | 12 |
| Lung | 16 017 | 74 | 57 | 4011 | 18 | 13 |
| Breast | — | — | — | 6231 | 28 | 18 |
| Prostate | 5458 | 26 | 15 | — | — | — |
| All cancer ^a | 61 710 | 284 | 209 | 40 929 | 183 | 103 |
| Incidence | | | | | | |
| Year 2006 | | | | | | |
| Stomach | 4926 | 23 | 19 | 3178 | 14 | 9 |
| Colorectal | 17 423 | 81 | 65 | 13 205 | 60 | 36 |
| Lung | 19 681 | 91 | 78 | 3498 | 16 | 12 |
| Breast | — | — | — | 26 493 | 120 | 91 |
| Prostate | 24 055 | 112 | 86 | — | — | — |
| All cancer ^a | 100 601 | 467 | 391 | 86 972 | 393 | 290 |
| Year 2012 | | | | | | |
| Stomach | 4632 | 21 | 16 | 2954 | 13 | 7 |
| Colorectal | 19 728 | 91 | 66 | 14 073 | 63 | 34 |
| Lung | 19 266 | 89 | 70 | 5228 | 23 | 17 |
| Breast | — | — | — | 27 182 | 122 | 83 |
| Prostate | 29 877 | 137 | 98 | — | — | — |
| All cancer ^a | 104 851 | 482 | 367 | 103 417 | 463 | 319 |

Algunos autores afirman que la tendencia divergente entre la mortalidad y la incidencia observada para ambos sexos podría atribuirse a la influencia de los factores de riesgo del estilo de vida, etapa temprana de diagnóstico, un tratamiento más eficaz y mayor supervivencia (10). Independientemente de cualquier estabilización o reducción estimada del riesgo entre los sexos, la reciente implementación de programas de cribado en algunas regiones presumiblemente tendrán un impacto en la incidencia del cáncer colorrectal y crea una mejor perspectiva de supervivencia en el futuro (11).

Se ha apreciado, en cambio, diferente frecuencia relativa respecto a los diversos tramos del intestino grueso; así, se advierte una mayor frecuencia en el sexo femenino en cuanto a carcinomas de localización colónica. Existe en este hecho cierta influencia de la edad, ya que, aunque encuentra una relación cercana a la unidad en cáncer de colon, observa que antes de los 60 años existe un discreto predominio en mujeres y posteriormente a esta edad llega a ser más frecuente en hombres. Respecto a carcinomas rectales se ha observado una mayor incidencia en hombres. Cuando se comparan las localizaciones rectal y sigmoidea se constata una mayor frecuencia en hombres en la primera localización y de mujeres en la segunda. No obstante, otros autores afirman que, independientemente de la edad, los hombres tienen un riesgo mayor que las mujeres de ser diagnosticados de una neoplasia avanzada de colon-recto (12).

Si consideramos únicamente los carcinomas de tipo histológico mucinoso se destaca cierta preponderancia del sexo masculino.

Al igual que en el resto de España, en el 2008 el CCR en la comunidad andaluza representó la segunda causa de muerte por cáncer, tanto en hombres como en mujeres. El trabajo muestra que globalmente en el periodo de estudio, las tasas de mortalidad por CCR aumentaron en ambos sexos con un PAC del 2,6% en hombres y del 1,1% en mujeres. No obstante, en los hombres el mayor aumento se produjo entre 1990 y 1998 (PAC del 3,7%) con un crecimiento menor en los años siguientes (0,8%). En las mujeres, el mayor incremento de la mortalidad se originó en el periodo 1980-1996 (PAC del 2,9%) seguido de una disminución significativa (-1,0% de PAC) (9).

Los datos de mortalidad referentes a Málaga se muestran en las siguientes gráficas (fig. 4 y 5) (13). Aunque estos resultados van acorde a los publicados anteriormente a nivel estatal y local (14,15), parece ser que se confirma el aumento de las tasas globales de mortalidad por CCR y principalmente entre los hombres.

Figura 4. Mortalidad por CCR entre los años 1975 y 2008. Sexo masculino. Tasa ajustada a la población europea / 100000 (13)

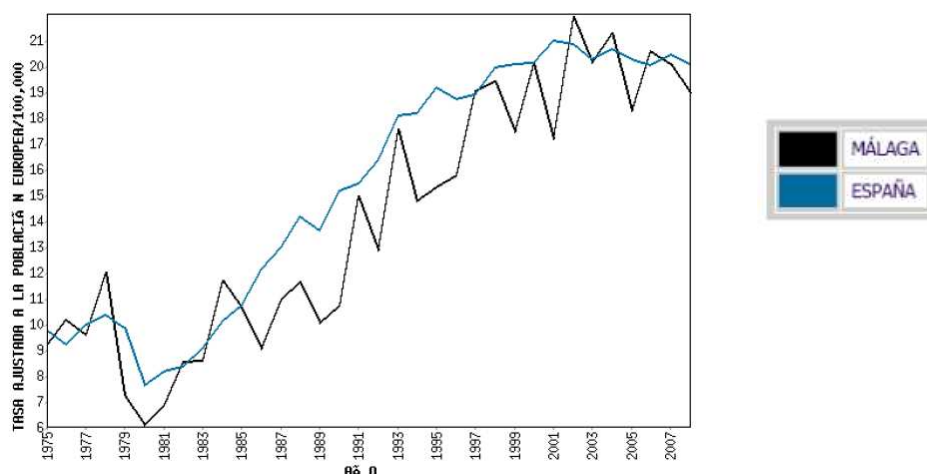
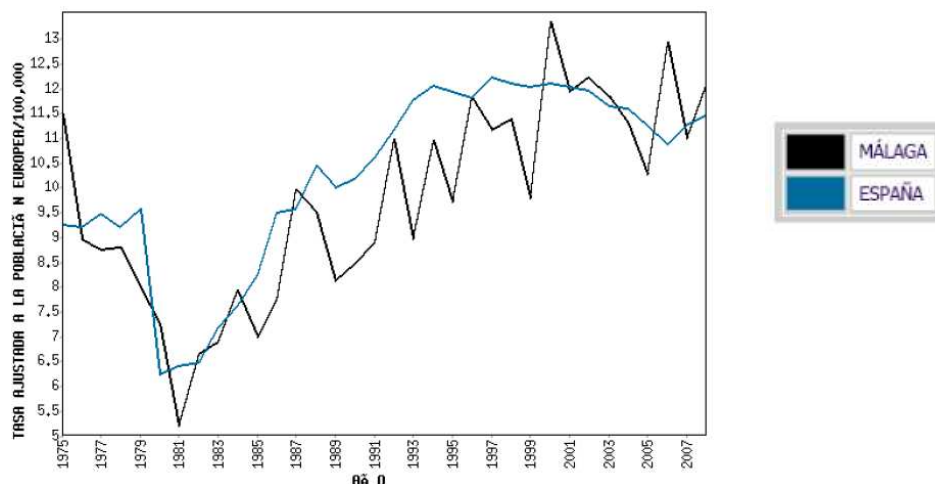


Figura 5. Mortalidad por CCR entre los años 1975 y 2008. Sexo femenino. Tasa ajustada a la población europea / 100000 (13)



1.3. Edad

El principal factor de riesgo es la edad. A partir de los 50 años el CCR es mucho más frecuente y la incidencia aumenta de manera exponencial con la edad. Es también una de las neoplasias que más se puede beneficiar de la prevención, a través de estrategias de prevención primaria y secundaria, estimando que entre el 66 y 75% de los casos de CCR se evitarían llevando un estilo de vida saludable (16).

La incidencia de carcinoma colorrectal se incrementa con la edad, siendo la edad media en el momento del diagnóstico entre 60 y 68 años. En países poco desarrollados (generalmente con una baja incidencia de carcinoma colorrectal) la edad media de presentación es, sin embargo, al menos 15 años menor.

Su aparición es muy rara en niños, adolescentes y adultos jóvenes, estimándose una frecuencia del 1,85 por ciento por debajo de los 35 años. No obstante, en pacientes jóvenes existe una mayor frecuencia de carcinomas mucinosos y pobremente diferenciados, que parecen conllevar un peor pronóstico.

Los carcinomas mucinosos, y también los de células en "anillo de sello", presentan una edad media de aparición algo menor que la del adenocarcinoma habitual, oscilando entre los 57 y 67 años.

La supervivencia de pacientes adolescentes o adultos jóvenes, es claramente más baja, y con una mortalidad elevada en los primeros dos años. Este peor pronóstico se atribuye a una alta proporción de tumores extendidos al diagnosticarlos en estas edades,

al tipo histológico más agresivo de dichos tumores y a la pobre respuesta al tratamiento no quirúrgico a que han de ser sometidos.

2. HISTORIA NATURAL

2.1. Factores etiológicos

La etiología del CCR, posiblemente, es multifactorial. La alta frecuencia parece estar más estrechamente relacionada con factores ambientales que con factores genéticos o raciales.

Los hábitos dietéticos parecen ser los más implicados en la patogenia de este cáncer. Más del 70% de los casos de CCR son esporádicos y están relacionados con el estilo de vida, de manera que una alimentación pobre en fruta, verdura, fibra, calcio y vitamina D, una ingesta excesiva de carne roja y procesada, aumento del consumo de azúcar, grasas saturadas y alcohol, llevar una vida sedentaria, ser obeso y fumar, son factores de riesgo para este cáncer (4, 6, 7, 17, 18, 19). Este tipo de alimentación es, por otra parte, propio de países desarrollados donde la incidencia de carcinoma colorrectal es más alta. Además, cuando la dieta de tipo “western-type” (comida altamente calórica, rica en grasas animales) es adoptada por poblaciones de baja incidencia en CCR, se observa un aumento del ratio de la misma (3).

La prevalencia de obesidad en España es elevada y, junto con Italia, Polonia y la República Checa, lideran las estadísticas europeas, y continua con tendencia creciente. Se cree que los cambios en la dieta mediterránea causada por la urbanización y la globalización de determinados estilos de vida son los principales responsables de la obesidad en España (19). Conforme a los datos de la Encuesta Nacional de Salud, para el período 1993-2005, ha habido un aumento identificado en la prevalencia de obesidad mórbida de 1,8 a 6,1 casos por 1.000 habitantes / año.

La presencia de carcinógenos en las heces, en base a estos tipos de dieta, sería el factor desencadenante de la mutagénesis en el epitelio de colon. Entre las sustancias tóxicas se le ha asignado un papel relevante a algunos ácidos biliares, como el ácido desoxicólico, y a ciertos ácidos grasos, como el ácido oleico.

La dieta también parece jugar un importante papel en la etiopatogenia del CCR, condicionando otros factores como el hábito estreñido (que conlleva un mayor tiempo de contacto con los carcinógenos), la existencia de una flora bacteriana anómala y la composición química de las heces. Sin embargo, la naturaleza precisa de esta relación dieta- carcinoma está lejos de estar establecida.

Los exfumadores, tras abandonar el hábito tabáquico durante más de 10 años, presentan un mayor riesgo en comparación con los no fumadores, siendo la cantidad de tabaco fumado más importante que el número de años como fumador (18).

La asociación entre la incidencia de cáncer colorrectal y los factores asociados con el estilo de vida (arriba descritos) deben ser considerados para decidir la estrategia seguir para una prevención eficaz (20).

Los factores genéticos juegan un importante papel en los pacientes con poliposis familiar o síndrome de Gardner, de herencia autosómica dominante y evidente tendencia a padecer carcinoma colo-rectal. Existe, asimismo, el cáncer de colon hereditario, autosómico dominante, no asociado a poliposis. Además de esta clara influencia genética en el desarrollo de algunos carcinomas, estudios epidemiológicos retrospectivos han mostrado que los familiares de pacientes con carcinoma colorrectal presentan un riesgo elevado de desarrollar esta neoplasia. Este riesgo aumenta incluso cuando son más de uno los familiares afectados y se encuentra relacionado con la edad. De esta manera, los pacientes mayores de 40 años con familiares que padecen de carcinoma de colon se convierten en una población que podría beneficiarse de los métodos de detección temprana de dicha enfermedad.

Entre los factores etiológicos figuran, también, las enfermedades inflamatorias intestinales de larga evolución, cuyo mayor riesgo de desarrollo de carcinoma de colon está reconocido. En piezas de resección de colon por enfermedad inflamatoria crónica se pueden encontrar carcinomas en un 15% de los casos con displasia moderada o severa. Los pacientes con colitis ulcerosa extensa, de siete años o más de evolución, sobre todo aquellos de comienzo temprano de la enfermedad, son incluidos en la población de alto riesgo. De igual modo, la enfermedad de Crohn de larga evolución presenta una mayor propensión al desarrollo de adenocarcinoma que la población normal. Este riesgo ha sido incluso comparado al de la colitis ulcerosa. A pesar de los episodios recurrentes de inflamación en la enfermedad diverticular, la diverticulitis no ha demostrado ser un factor de riesgo específico para desarrollar CCR (3).

La exposición de la población a la contaminación industrial se ha relacionado con la mortalidad debida a tumores del sistema digestivo, entre ellos el del cáncer colorrectal, y esta podría ser más alta entre las poblaciones que residen en las proximidades de fuentes industriales del sector del metal (21).

2.2. Morfopatología

- Localización

El 50% aproximado de todos los carcinomas ocurren en la región recto-sigmoidea,

Se ha observado un aumento significativo de carcinomas de localización proximal con la edad. Asimismo, se ha podido apreciar un considerable aumento de los carcinomas de sigma y disminución de los de recto (3,22).

En consonancia con estos hallazgos, se ha encontrado una disminución en el porcentaje de tumores localizados en el tercio medio e inferior de recto, lo cual supone una de las causas del aumento de la proporción de pacientes en los que una cirugía con conservación del mecanismo esfinteriano ha podido llevarse a cabo (23).

Se ha demostrado implicaciones de la edad y el sexo en este cambio de localización. Para algunos autores existe, con respecto a la edad, una disminución de la incidencia de cáncer en colon izquierdo y recto, un aumento en el derecho y no se detecta cambio en el transversal, siendo todo ello estadísticamente significativo sólo para el sexo femenino. Para Ackerman y Rosai (22), los tumores de localización derecha son más frecuentes en los ancianos, en la raza negra y en pacientes con enfermedad diverticular.

Este cambio de localización del carcinoma colo-rectal conlleva, por lo tanto, al replanteamiento de los métodos de *screening*, restándole importancia al examen digital y con sigmoidoscopia, favoreciendo técnicas como la detección de sangre oculta en heces, enema de bario o colonoscopia.

En cuanto al tipo histológico de tumor respecto a la localización, puede decirse que en los carcinomas mucinosos la localización predominante es el recto, aunque, en relación al número de carcinomas no mucinosos observados en cada una de ellas, el porcentaje de aquéllos disminuye de derecha a izquierda del intestino. El origen habitual de los carcinomas de células "en anillo de sello" es sigma o recto (22).

Parece existir alguna correlación entre la localización del tumor y el pronóstico. Los carcinomas de ciego tienden a ser menos invasores y dan lugar a un porcentaje menor de metástasis ganglionares. Por el contrario, los carcinomas de recto y área recto-sigmoide infiltran más rápidamente la pared y metastatizan con mayor frecuencia (22).

Sin embargo, los carcinomas de colon derecho se encuentran en el estadio D de Dukes con mayor frecuencia que los de recto y, en cambio, el porcentaje de tumores en el estadio A en el recto – sigma es superior a los localizados en el colon derecho. En ambos estadios el colon izquierdo cae en una situación intermedia. Estos hallazgos, se correlacionan con la observación de un mejor pronóstico para los carcinomas de localización cólica izquierda y recto y peor pronóstico para los localizados en colon derecho y transversal (24), aunque esto no se ha corroborado por otros autores (25).

- **Tamaño del tumor**

El tamaño de los CCR ha sido considerado de escaso valor pronóstico, al contrario de lo que sucede en otros tipos de neoplasias, como el carcinoma de mama, donde sí existe una importante relación del tamaño tumoral con la supervivencia (26).

Ackerman y Rosai (22) consideran que cuando más grande es el tumor peor es el pronóstico, si bien reconocen que existen notables excepciones. Otros autores (27) encuentran que el pronóstico es independiente del tamaño siempre que este sea resecable. En cambio, Wolmark et al (28), afirman que existe una sutil relación entre el tamaño tumoral y la incidencia de afectación ganglionar.

- **Tipos histológicos**

La clasificación, según la OMS (2010) (3), de los tumores epiteliales malignos de colon y recto (excluyendo, por tanto, el canal anal) presenta las siguientes variedades (tabla 3):

Tabla 3: Clasificación histológica de la OMS para los tumores de colon y recto (3).

Clasificación de la OMS del Carcinoma Colorrectal

Adenocarcinoma

Adenocarcinoma mucinoso (coloide) (más del 50% de componente mucinoso)

Carcinoma de células en anillo de sello (más del 50% de células en anillo de sello)

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma medular

Carcinoma neuroendocrino de alto grado

Carcinoma neuroendocrino de células grandes

Carcinoma neuroendocrino de células pequeñas

Carcinoma indiferenciado

Otros (especificar)

El hallazgo definitivo del CCR es la invasión a través de la “muscularis mucosae” en la submucosa. El Adenocarcinoma NOS (no especificado o de tipo usual) supone más del 90% de todos los carcinomas de colon y recto. Histológicamente, las células tumorales representan una combinación de células columnares y caliciformes, con participación ocasional de células endocrinas (22). Suele presentar un patrón de crecimiento principalmente de tipo glandular, con variabilidad en el tamaño y la configuración de las estructuras glandulares. En los adenocarcinomas bien y

moderadamente diferenciados, las células epiteliales son grandes y altas, y la luz glandular contiene restos celulares. La gran mayoría de los adenocarcinomas de tipo usual muestran relativamente pequeñas cantidades de producción de moco. Además, crea una reacción inflamatoria y desmoplásica, la cual es particularmente prominente en los bordes del tumor.

Existen diferentes variantes histopatológicas, algunas de las cuales se asocian a características moleculares específicas (3).

Los carcinomas de tipo mucinoso son aquellos adenocarcinomas que están constituidos en su mayor parte por lagos de mucina. Esta designación se usa cuando más del 50% del tumor está compuesto de mucina. Microscópicamente, se caracteriza por lagos de mucina extracelular que contiene células epiteliales malignas dispuestas en estructuras acinares o sueltas individualmente, incluyendo células en anillo de sello. Su frecuencia oscila entre el 10 y el 20% de todos carcinomas colo-rectales. Dichas células se encuentran usualmente flotando en el material mucoide y a veces revistiendo parcialmente la cavidad ocupada por el moco. Los carcinomas mucinosos presentan una supervivencia menor a los 5 años que los adenocarcinomas no mucinosos. Sin embargo, este hecho sólo es estadísticamente significativo para las lesiones situadas en el recto. Los carcinomas con áreas mucinosas inferiores al 50% se deben de categorizar como: *con componente mucinoso*. El nivel de maduración del epitelio determina la diferenciación, pero muchos adenocarcinomas mucinosos con alto nivel de inestabilidad de microsatélites (IMS-A) son de bajo grado. Mientras que los adenocarcinomas mucinosos que tienen estabilidad de microsatélites o bajos niveles de inestabilidad llegan a ser lesiones de alto grado (3).

Ikeda et al (29), definieron dos tipos de patrón de crecimiento en el CCR mucinoso (figura 6):

1. El tipo “fixxed” (FIX): tienen glándulas revestidas por un epitelio columnar, secretor de moco, junto con mucina intersticial e intraglandular.
2. El tipo “floating” (FLO): tiene cadenas, islotes o grupos irregulares de células rodeada por moco.

Figura 6. Tipo de CCR mucinoso

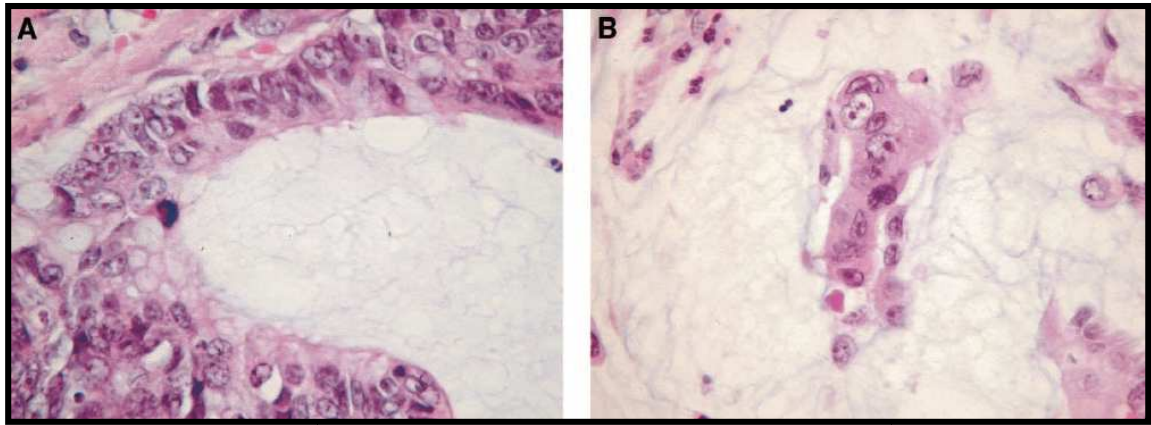


Figura 6 modificada de Ikeda et al. Satoshi. Immunohistochemical and Mutational Analyses of β -catenin, Ki-ras, and p53 in Two Subtypes of Colorectal Mucinous Carcinoma. Clin Cancer Res 2003. A: tinción H&E del tipo FIX. B: tinción H&E del tipo FLO (29).

Los carcinomas de células "en anillo de sello" son una entidad rara en el intestino grueso. Se definen por la presencia de más del 50% de células tumorales con mucina intracitoplasmática prominente. Están constituidos principalmente por células anaplásicas con abundante mucina intracitoplásmica, que desplaza el núcleo a la periferia y lo moldea, confiriendo la típica imagen que le da nombre. Estas células en anillo de sello pueden encontrarse en "pools" de mucina de un adenocarcinoma mucinoso o en un proceso infiltrativo difuso con mínima mucina extracelular. Se asocian, en general, a una muerte temprana con una supervivencia menor aún que la de los pacientes con carcinomas mucinosos.

Considerado de forma global, parece que el tipo histológico tiene una importancia pronóstica secundaria, observándose que el tipo de tumor no añade información pronóstica útil por encima de otros parámetros como las metástasis en ganglios linfáticos, extensión del tumor, carácter del margen invasivo e infiltración linfocítica peritumoral. No obstante, la AJCC/UICC acepta que los carcinomas de células en anillo de sello, carcinoma de células pequeñas y carcinomas indiferenciados son de alto grado, aunque los únicos tipos histológicos que han demostrado tener significación pronóstica adversa independiente del estadio tumoral son el carcinoma de célula en anillo de sello y el carcinoma de célula pequeña (30).

- Grados de diferenciación cito-histológica

La gradación histológica se mantiene como índice pronóstico tradicional a la hora de evaluar los CCRs. Se aprecia un claro descenso de la supervivencia conforme empeora la malignidad histológica del tumor. Así mismo, relacionan el nivel de diferenciación del tumor con su capacidad metastásica, de manera que la incidencia de metástasis en ganglios linfáticos es claramente menor en los bien diferenciados que en los pobremente diferenciados (31).

Algunos autores aprecian influencia del grado histológico sobre la supervivencia sólo en carcinomas en estadio C de Dukes. Encuentran que el valor pronóstico de este parámetro es debido, en su mayor parte, a los tumores pobremente diferenciados, ya que entre los moderadamente y bien diferenciados la probabilidad de supervivencia es similar (32).

Quizás, estos resultados divergentes sean simplemente atribuibles a la variedad de criterios entre patólogos y a la subjetividad que conllevan la mayoría de ellos. Esto puede invalidar en gran parte la importancia predictiva de este factor (33).

Se han sugerido un gran número de sistemas de clasificación para el cáncer colorrectal. Pero en la actualidad, la mayoría de los sistemas de estratificación de los tumores gradan en 3 o 4 grados en base a la formación de estructuras glandulares y se subdividen de la siguiente forma (30):

- Grado 1: Bien diferenciado. Lesiones que muestran estructuras glandulares en más del 95% del tumor.
- Grado 2: Moderadamente diferenciado. Lesiones con estructuras glandulares ocupando el 50 – 95% del tumor.
- Grado 3: Pobremente diferenciado. Lesiones que exhiben estructuras glandulares ocupando el 5 – 50% del tumor.
- Grado 4: Indiferenciado. Actualmente, es un término de exclusión reservado para tumores epiteliales malignos que muestran práctica ausencia de formación glandular (<5%), producción de mucina o diferenciación neuroendocrina, escamosa o sarcomatoide.

A pesar de un importante grado de variabilidad entre observadores (33), el grado

histológico ha sido demostrado repetidamente por el análisis multivariante como un factor pronóstico independiente (34). Especialmente, se ha demostrado que el grado tumoral alto es un factor pronóstico adverso. Es de destacar que en la mayoría de estudios que documentan la potencia pronóstica del grado tumoral, el número de grados ha sido reunificado para producir una estratificación en 2 niveles, tal y como sigue (3, 30):

- De bajo grado: bien diferenciado y moderadamente diferenciado.
- De alto grado: pobremente diferenciado.

Las mayores variaciones radican en la estratificación de las categorías de tumores de bajo grado en bien o moderadamente diferenciados, mientras que la variabilidad inter-observador en el diagnóstico de carcinoma de alto grado es relativamente pequeño. Por lo tanto, teniendo en cuenta su valor pronóstico demostrado, la relativa sencillez y reproducibilidad, se ha recomendado usar un sistema de clasificación en 2 niveles (es decir, de bajo grado y de alto grado), cuyos criterios de clasificación basados en la formación glandular son sólo sugerencias (30,35):

- Bajo grado = formación glandular mayor o igual al 50% del tumor.
- Alto grado = Formación glandular menor al 50% del tumor.

Cuando un carcinoma tiene heterogeneidad en la diferenciación, la gradación se debe basar en el componente menos diferenciado, sin incluir para la valoración el frente invasivo. Pero la presencia de yemas tumorales infiltrantes (“tumour budding”) con focos pobremente diferenciados, caracterizados por formaciones glandulares rudimentarias y células tumorales individuales infiltrantes se ha asociado a un comportamiento agresivo (3).

Según la 3ª edición de la OMS (2000), los adenocarcinomas mucinosos y de células en anillo de sello son considerados, por convicción, pobremente diferenciados (grado 3). En la actual (4ª ed, 2010), se recoge que el grado morfológico se debe aplicar sólo a adenocarcinomas NOS (no especificado), ya que las otras variantes morfológicas conllevan sus propios criterios específicos y pronósticos. Así, por ejemplo, el adenocarcinoma mucinoso o el de células en anillo de sello se consideran pobremente diferenciados (con peor pronóstico) siempre que no estén asociados a alta inestabilidad de microsatélites (IMS-A) (3). Por último, los adenocarcinomas y los carcinomas indiferenciados que tienen una alta inestabilidad de microsatélites, son considerados de bajo grado (3).

- **Tipo de patrón infiltrante**

El margen infiltrante de los carcinomas colo-rectales puede observarse histológicamente como bien definido o expansivo (rechazando en su crecimiento a las estructuras vecinas), o bien como una forma de crecimiento digitiforme (disecando y separando elementos contiguos de los tejidos que invade). De esta última forma se presentan al menos una cuarta parte de los tumores, correspondiéndole al resto márgenes de tipo expansivo (26,36).

Este aspecto histológico del tumor representa una información pronóstica adicional. Los pacientes con tumores de margen infiltrante presentan, en general, menor supervivencia que los de bordes bien definidos o expansivos y confiere a este parámetro un valor de gran relevancia para la gradación histológica de malignidad del tumor. Para Ackerman y Rosai (22), la presencia de unos márgenes tumorales infiltrantes conlleva una mayor incidencia de metástasis linfáticas o a distancia.

- **Invasión vascular**

El pronóstico de supervivencia en el CCR se ve seriamente afectado por la presencia de invasión venosa. Su presencia, aunque no significa de forma inevitable diseminación metastásica, sí se correlaciona con una mayor frecuencia de ésta. Si bien parece que la supervivencia sólo se afecta cuando el margen infiltrante del tumor invade las venas localizadas más allá de la pared muscular intestinal. La diseminación vascular vía linfática o sanguínea puede ocurrir en una fase temprana de la historia natural y, por tanto provocar una afectación ganglionar linfoide y enfermedad diseminada (37).

Se ha postulado que la invasión venosa estaba relacionada con la invasión local, así como con el grado de diferenciación del tumor, observándose más frecuentemente en los carcinomas que se extendían ampliamente más allá de la pared rectal y en los pobremente diferenciados. A pesar de la presencia de vasos linfáticos en la mucosa colo-rectal, la diseminación linfática no ocurre a menos que la “muscularis mucosae” esté sobrepasada y la submucosa invadida. La afectación de venas y vénulas que son tributarias de la vena porta en el colon y de la vena cava en el recto contribuyen a una diseminación hematológica (3,38).

- **Respuesta celular peritumoral**

Se ha apreciado un importante efecto del infiltrado linfocítico sobre la supervivencia, y consideran este parámetro como la variable relativa al tumor que

mayor información pronóstica aporta, siendo, además, independiente del estadio (36). Se ha demostrado que la presencia de un severo infiltrado linfo-plasmocitario en los márgenes del tumor se correlaciona con una mayor supervivencia a los cinco años. También ha sido observada una relación inversa de la cantidad de infiltrado linfo-plasmocitario con el número de metástasis (22).

La respuesta inmune celular ante la neoplasia puede observarse tanto a nivel del margen invasivo de ésta como en los ganglios linfáticos regionales. Generalmente, no más de una cuarta parte de los carcinomas colo-rectales presentan un pronunciado infiltrado linfocitario en su zona de crecimiento. Son mayoría, pues, los que muestran cierto infiltrado disperso o en pequeños cúmulos y aquellos en los que la reacción celular está prácticamente ausente. Las neoplasias que contienen márgenes infiltrantes expansivos e infiltrado inflamatorio crónico en la interfase entre el tumor y el tejido circundante (compuesto de linfocitos, células plasmáticas y cambios degenerativos en el seno tumoral) muestran un mejor pronóstico que aquellos que carecen de estos hallazgos (39, 40, 41).

Además, la presencia de esta respuesta linfocitaria peritumoral se ha asociado con alta inestabilidad de microsátélites (IMS-A) (3). Respecto al estadio, se encuentra una diferencia significativa entre la cantidad de infiltrado linfocitario presente en el estadio B de Dukes y la observada en el C, siendo en estos más frecuente la ausencia o escasez de infiltrado (42).

2.3. Evolución

- Diseminación loco-regional

Una vez establecido, el cáncer inicia su progresión local y regional.

Inicialmente, el crecimiento local se realiza en sentido circular y, sobre todo, en forma de penetración perpendicular a través de la pared. La progresión en sentido lateral es escasa y limitada. Una vez atravesadas todas las capas de la pared intestinal, y alcanzada la serosa, puede ocurrir la afectación de órganos vecinos; esto tiene lugar con más frecuencia en tumores localizados en sigma y recto, llegando, en ocasiones, a provocar fístulas con otros órganos como asas intestinales, vejiga o vagina.

La afectación linfática con invasión ganglionar, sucede de forma anatómicamente ordenada, desde los ganglios paracólicos a los principales en el origen de los vasos mesentéricos. La afectación ganglionar es más frecuente en los tumores que muestran áreas pobremente diferenciadas y un patrón de crecimiento altamente infiltrante (43). Además, el compromiso linfático es raro en ausencia de penetración total o parcial de la

pared. De igual manera, apenas se observan metástasis a distancia si los ganglios no están afectos. La vía de diseminación linfática retrógrada solo ocurre si hay bloqueo ganglionar.

El recto drena también a los linfáticos mesentéricos inferiores, a través de la vía hemorroidal superior. Por debajo de los 8 cm puede drenar a los iliacos internos, por los hemorroidales medios, y por debajo de los 3 cm a los inguinales, a través de los perineales. Este hecho y la ausencia de serosa a partir de la reflexión peritoneal merecen especial consideración en el diagnóstico y tratamiento. Por último, es importante decir que se ha estimado que el número mínimos de ganglios resecados de un espécimen quirúrgico de carcinoma colo-rectal debe ser de catorce o quince (44,45).

Se ha asociado a peor pronóstico cualquiera de las siguientes situaciones: afectación de numerosos ganglios linfáticos o una proporción alta de los ganglios resecados; la afectación de aquellos ganglios que estén cercanos al margen mesentérico y/o a gran distancia del tumor primario o de localización retrógrada (3, 46, 47).

- **Metástasis a distancia**

El paso a la circulación sanguínea a través de la invasión de venas que drenan a los vasos mesentéricos, hace que el hígado sea un sitio de localización preferente de metástasis. En las neoplasias de recto pueden producirse metástasis pulmonares en ausencia de hepáticas, al eludir la circulación portal a través de los vasos hemorroidales medios e inferiores. El hígado es el lugar más frecuente de diseminación a distancia, sea cual sea la localización del tumor, y su afectación es más común en los tumores que muestran invasión de vasos sanguíneos. El segundo en frecuencia es el pulmón, predominando aquí el origen en recto o sigma por las razones antes expuestas. La pelvis es otro lugar habitual de diseminación. El resto de los órganos presentan un menor número de metástasis. Aún cuando las glándulas adrenales son frecuentemente afectadas, por lo general ello se asocia a enfermedad diseminada. Las metástasis óseas se suelen observar en carcinomas de recto, mientras que las pancreáticas habitualmente proceden de tumores asentados en colon derecho. Probablemente por un mecanismo de siembra directa, el intestino delgado, peritoneo y ovario son invadidos con cierta asiduidad por tumores. Algunas de las metástasis del Adenocarcinoma colo-rectal pueden simular neoplasias primarias de los respectivos órganos (48). Esto ocurre particularmente en el ovario, en el cual las metástasis se pueden mal diagnosticar como un carcinoma endometriode o de células claras primario (49).

- **Extensión del tumor: clasificación TNM. Estadios patológicos**

En base a la extensión loco-regional y a distancia del CCR han sido varias las clasificaciones establecidas por diversos autores, en un intento de predecir el pronóstico de supervivencia de los pacientes.

La clasificación propuesta por Cuthbert Dukes en 1932 para el cáncer rectal es la base para muchos de los sistemas de estadificación del CCR, incluyendo el sistema actual TNM (3), el cual, ha reemplazado a otras clasificaciones gracias a su gran utilidad y estandarización.

El sistema TNM es tanto de aplicación clínica, o pretratamiento, como anatomo-patológica o post-quirúrgica (pTNM). No obstante, ante la dificultad de acceso clínico a los carcinomas de colon, se requiere la evaluación pTNM como sistema de clasificación.

Este sistema TNM fue introducido por la “American Joint Committee on Cancer”/Unión Internacional Contra el Cáncer (AJCC/UICC) en 1950, basándose en la extensión loco-regional y a distancia de tumores malignos. Significando las categorías: T, extensión del tumor primario que, en el colon se basa en la profundidad de invasión tumoral de la pared intestinal (relacionado principalmente con la capa muscular propia); N, estado de los ganglios linfáticos regionales; y M, ausencia o presencia de metástasis a distancia. La actual clasificación TNM es la 7ª edición publicada en 2009 por la AJCC/UICC, accesible en la página web del “College American of Pathologist” (C.A.P., actualizada en 2012) (tabla 4). En comparación con la edición anterior se aprecian modificaciones tanto en las categorías T, N y M, como en los estadios (del I al IV) (3, 30, 50).

Los sufijos añadidos describen, en detalle, la cuantía de la extensión en cada caso, como se expone en la clasificación aplicada a los tumores colo-rectales (tabla 4) (30).

En los últimos años se están acumulando datos que indican que la invasividad local y la capacidad de extenderse a órganos a distancia pueden estar determinadas por diferentes genes. Es probable que la valoración del riesgo y por tanto la elección de tratamiento adyuvante, este influenciado por el perfil molecular del tumor y el genotipo del paciente (51).

Tabla 4. TNM del Protocolo de examen de especímenes con carcinoma primario de colon-recto. Basado en AJCC/UICC, 7th edición (30).

| Pathologic Staging (pTNM) (Note M) | |
|---|---|
| TNM Descriptors (required only if applicable) (select all that apply) | |
| <input type="checkbox"/> | m (multiple primary tumors) |
| <input type="checkbox"/> | r (recurrent) |
| <input type="checkbox"/> | y (posttreatment) |
| Primary Tumor (pT) | |
| <input type="checkbox"/> | pTx: Cannot be assessed |
| <input type="checkbox"/> | pT0: No evidence of primary tumor |
| <input type="checkbox"/> | pTis: Carcinoma in situ, intraepithelial (no invasion of lamina propria) |
| <input type="checkbox"/> | pTis: Carcinoma in situ, invasion of lamina propria/muscularis mucosae |
| <input type="checkbox"/> | pT1: Tumor invades submucosa |
| <input type="checkbox"/> | pT2: Tumor invades muscularis propria |
| <input type="checkbox"/> | pT3: Tumor invades through the muscularis propria into pericolorectal tissues |
| <input type="checkbox"/> | pT4a: Tumor penetrates the visceral peritoneum |
| <input type="checkbox"/> | pT4b: Tumor directly invades or is adherent to other organs or structures |
| Regional Lymph Nodes (pN) | |
| <input type="checkbox"/> | pNx: Cannot be assessed |
| <input type="checkbox"/> | pN0: No regional lymph node metastasis |
| <input type="checkbox"/> | pN1a: Metastasis in 1 regional lymph node |
| <input type="checkbox"/> | pN1b: Metastasis in 2 to 3 regional lymph nodes |
| <input type="checkbox"/> | pN1c: Tumor deposit(s) in the subserosa, or non-peritonealized pericolic or perirectal tissues without regional lymph node metastasis |
| <input type="checkbox"/> | pN2a: Metastasis in 4 to 6 regional lymph nodes |
| <input type="checkbox"/> | pN2b: Metastasis in 7 or more regional lymph nodes |
| Distant Metastasis (pM) | |
| <input type="checkbox"/> | Not applicable |
| <input type="checkbox"/> | pM1: Distant metastasis |
| | + Specify site(s): _____ |
| <input type="checkbox"/> | pM1a: Metastasis to single organ or site (eg, liver, lung, ovary, nonregional lymph node) |
| <input type="checkbox"/> | pM1b: Metastasis to more than 1 organ/site or to the peritoneum |

Con respecto al estadio, en base a la clasificación de Cuthbert E. Dukes, se establecieron tres categorías: el tipo A, cuando el carcinoma estaba limitado a la pared rectal, sin extensión a ganglios linfáticos ni tejidos adyacentes; el tipo B, cuando la lesión neoplásica se extendía por continuidad directa a los tejidos de alrededor, sin afectación de los ganglios linfáticos, y, finalmente, el tipo C, que englobaba aquellos casos con metástasis en ganglios linfáticos, además de penetración directa en la pared (52,53).

Posteriormente, se subdividieron el estadio C en: C-1, cuando sólo los ganglios linfáticos regionales están afectados, y C-2 cuando la extensión -por vía linfática- llega a los ganglios situados en el punto de ligadura de los vasos sanguíneos (54). En 1949, se introdujeron algunas modificaciones en esta clasificación. El tipo C incluía carcinomas con metástasis ganglionares, obviando la invasión parcial o total de la pared, que es B-1 o B-2 respectivamente. En 1954, Astler y Coller (55), modificaron la clasificación de Kirklin subdividiendo el tipo C en C-1, tumores limitados a la pared con ganglios linfáticos afectados, y C-2, en el cual existe invasión a través de toda la pared asociada a metástasis linfáticas. Posteriormente se utilizó otro sistema de estadificación en el que

cada estadio se divide en subestadios (A1, A2, A3, B1, B2, C1, C2), siguiendo paso a paso el curso natural de la invasión tumoral a través de las diferentes capas de la pared intestinal y su extensión a linfáticos locales y regionales. El estadio D comprende todos los casos con metástasis a distancia y se suele incorporar a las clasificaciones anteriores, aunque realmente fue introducido en 1967.

En base a la clasificación TNM, el grupo “Unión Internacional Contra el Cancer”/ “American Joint Committee on Cancer” (UICC/AJCC) publicó una clasificación de grupos de estadios, cuya versión actual se detalla a continuación (tabla 5) (30):

Tabla 5. Estadios basados en el TNM. AJCC/UICC, 7th edición (30).

| <u>TNM Stage Groupings</u> | | | |
|----------------------------|--------|-------|-----------------|
| Stage 0 | Tis | N0 | M0 [#] |
| Stage I | T1 | N0 | M0 |
| | T2 | N0 | M0 |
| Stage IIA | T3 | N0 | M0 |
| Stage IIB | T4a | N0 | M0 |
| Stage IIC | T4b | N0 | M0 |
| Stage IIIA | T1-T2 | N1 | M0 |
| | T1 | N2a | M0 |
| Stage IIIB | T3-T4a | N1 | M0 |
| | T2-T3 | N2a | M0 |
| | T1-T2 | N2b | M0 |
| Stage IIIC | T4a | N2a | M0 |
| | T3-T4a | N2b | M0 |
| | T4b | N1-N2 | M0 |
| Stage IVA | Any T | Any N | M1a |
| Stage IVB | Any T | Any N | M1b |

[#] M0 is defined as no distant metastasis.¹

Esta estadificación patológica (basándose en el TNM anatómico) se realiza generalmente después de la resección quirúrgica del tumor primario. La estadificación patológica depende de la documentación patológica de la extensión anatómica de la enfermedad, y de si el tumor primario ha sido completamente eliminado. También depende de si las categorías T y N más altas o la categoría M1 del tumor puede ser confirmada microscópicamente y si los criterios para la clasificación y la estadificación patológica se han satisfecho sin la eliminación total del cáncer primario (30).

El número de ganglios linfáticos con metástasis también parece presentar una buena correlación con la supervivencia. Se ha demostrado que pacientes con CCR con más de cinco ganglios linfáticos afectados tienen una pobre supervivencia. Cuando existen pocos ganglios linfáticos afectados, o el tumor está confinado a la pared

intestinal pero los ganglios están afectados, la esperanza de vida no se ensombrece considerablemente. Ante la existencia de metástasis ganglionares, la cantidad de ganglios sin metástasis no afecta al pronóstico (30).

El principal factor pronóstico del CCR es el estadio en el momento del diagnóstico. La supervivencia del CCR a los 5 años se encuentra alrededor del 50-55%, siendo mucho mayor en estadios iniciales (75-90%) que en los avanzados (menor al 15%) (56). A medida que el estadio aumenta de I a IV, la supervivencia a 5 años desciende desde mayor de 90% a menos del 10% (3,57).

- **Recidiva local**

Después de la cirugía radical satisfactoria se suceden recurrencias locales, en un 25% de los pacientes. Esta suele desarrollarse dentro de los primeros años que siguen a la cirugía. La pared vaginal y el fondo de saco de Douglas, en mujeres, y el área presacra, en hombres, suelen ser los lugares predilectos de recidiva.

La resección quirúrgica es el tratamiento de elección para más de 2/3 de los CCRs. no metastásicos, y la herramienta más útil para establecer el pronóstico de la enfermedad es el estudio anatomopatológico de la pieza resecada. Sin embargo, tras una resección potencialmente curativa de un CCR localizado, entre un 30 y un 50% de los pacientes presentarán recidiva en los 5 años siguientes al tratamiento inicial, preferentemente con metástasis a distancia, aunque también como recurrencias loco-regionales o lesiones colo-rectales metacrónicas (58). Se considera que estas recaídas podrían ser debidas a enfermedad micro-metastásica ya presente en el momento de la cirugía.

La tasa de recurrencia local es mayor cuando el tumor tiene una localización rectal extraperitoneal, quizás debido a la dificultad técnica que entraña la resección tumoral dentro de la cavidad ósea pélvica (23).

- **Causas de muerte**

La muerte en pacientes con CCR es debida principalmente a diseminación de la enfermedad. En menor cuantía, son los efectos compresivos o destructivos de la recidiva local los que determinan el fallecimiento.

En relación a la localización del tumor primario, la insuficiencia hepática es la causa de defunción en los dos tercios de los pacientes con carcinoma de colon proximal; asiduamente, presentan una neumonía concomitante. En el tercio restante la muerte viene determinada por una suma de efectos locales, generalmente obstrucción uretral y

de daños sufridos por la diseminación a distancia.

En los carcinomas de sigma y recto, a pesar de la frecuente presencia en ellos de recidiva local, sólo en el 20% de los casos este hecho lleva al fallecimiento. Lo más habitual es que las metástasis hepáticas o pulmonares, o la malnutrición, acaben con la vida de los pacientes (59).

3. VÍAS MOLECULARES IMPLICADAS EN EL CCR

3.1 Carcinogénesis colo-rectal

Las lesiones precursoras del carcinoma colorrectal han sido objeto de numerosos estudios basados en el modelo de carcinogénesis colónica propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990 (60,61) (fig. 4). Este modelo establece que la progresión morfológica de un pólipo adenomatoso con atipia moderada a severa (carcinoma in situ) a carcinoma invasivo y metastásico se acompaña por (y presumiblemente se causa por) una serie de alteraciones moleculares. Estas alteraciones incluyen la activación mutacional de oncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales. Se cree que son necesarios, al menos, cuatro o cinco genes mutados para producir un fenotipo completamente maligno. Esto debe incluir la mutación activadora del oncogén Ras, mutaciones en el gen p53 y delección del gen DCC. Un cambio adicional (muy temprano) es la mutación del gen APC (22). Cada una de estas alteraciones genéticas secuenciales confiere a las células afectadas un fenotipo más maligno y disminuye su dependencia a las señales del medio ambiente (3,62).

Figura 7. Diagrama morfológico y genético de la carcinogénesis colo-rectal (61)

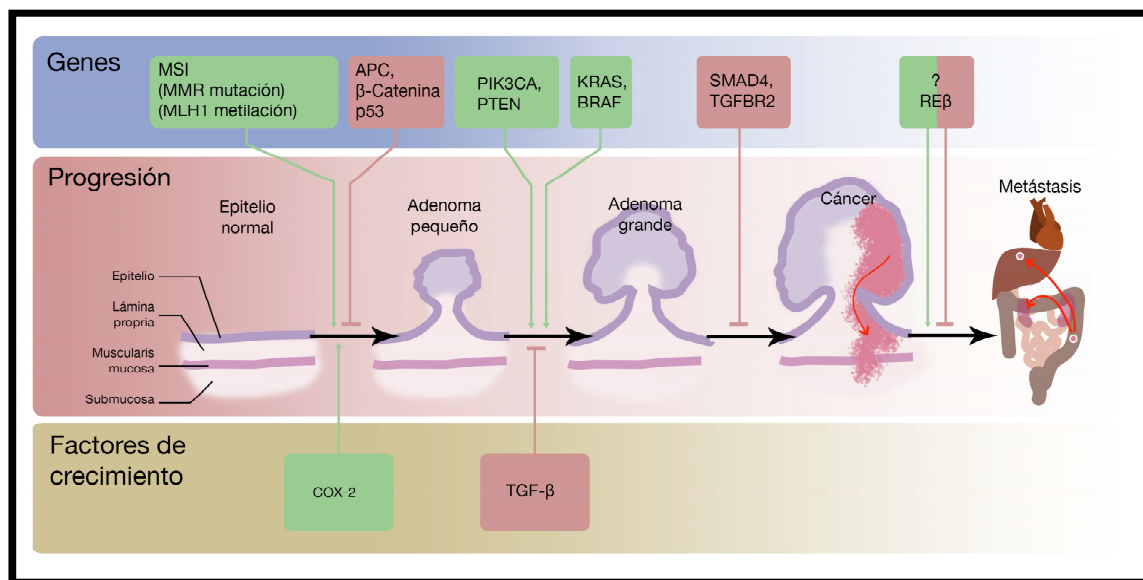


Figura 7 modificada de Markowitz S et al. Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med 2009; MSI: inestabilidad microsatélite; APC: adenomatous polyposis coli; PI3KCA: kinasa fosfatidilinositol - 3(subunidad catalítica); PTEN: fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; K-RAS: gen K-RAS (rats sarcomas); COX-2: ciclooxigenasa-2; TGF- β: factor de crecimiento transformate β; REβ: receptores estrogénicos β.

Fueron los estudios de biología y genética molecular desarrollados en los síndromes de cáncer colo-rectal no polipósico y en la poliposis colónica familiar, los que permitieron desvelar las alteraciones implicadas en esta secuencia y que son extrapolables al CCR esporádico (61). Paralelamente, en los últimos años, se ha producido un gran avance en la epigenética, que nos ha mostrado que mecanismos como la metilación y la acetilación de los genes están íntimamente relacionados con el proceso de carcinogénesis del CCR a través del silenciamiento o la activación de la función de esos genes (63).

Las alteraciones que conducen a la transformación maligna celular son:

1. **Inestabilidad cromosómica:** es la alteración más común en la mayoría de las neoplasias. Puede producirse por una modificación en el número de copias o cambios en la estructura del cromosoma. Transformaciones en los genes APC, p53 o SMAD4 son responsables de esta inestabilidad (64).

2. **Inactivación de genes reparadores de bases de DNA (o mismatch repair genes):** puede ser un defecto hereditario como ocurre en el síndrome de Lynch, o adquirido como se describe en el 15% de los CCR esporádicos. En los síndromes hereditarios, la alteración de estos genes reparadores se produce por una mutación en la línea germinal de MSH2 y MLH1, acompañados siempre de una mutación en la línea somática del alelo correspondiente. En los CCR no hereditarios, la inactivación se produce por un silenciamiento bialélico del promotor del gen MLH1. La inactivación de estos genes se asocia al fenómeno conocido como inestabilidad microsatélites, dando lugar a CCR (22, 65, 66, 67).

3. **Metilaciones de DNA:** es un proceso epigenético que consiste en la metilación de las citosinas de secuencias de dinucleótidos CpG y que ocurre en zonas de secuencias repetidas de DNA fuera de los exones. Esta acción es llevada a cabo por una DNA metilasa y define una quinta base (5-metilcitosina). En el CCR, se produce una metilación aberrante que afecta a zonas ricas en CpG situadas en el promotor del gen y que provoca un silenciamiento del mismo. Como ejemplo tenemos la metilación del gen MLH1 (68).

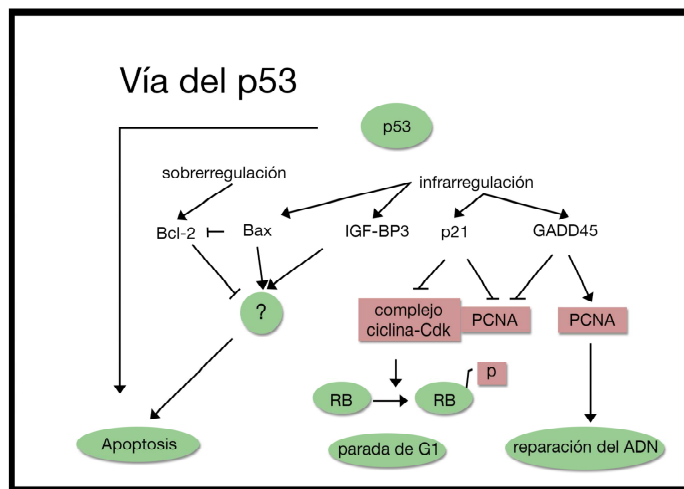
4. **Mutaciones de DNA:** este grupo engloba múltiples alteraciones en distintas vías que provocarán el desarrollo tumoral. Las alteraciones más importantes son:

a. **Mutación del gen APC:** Uno de los cambios considerados iniciadores del proceso de carcinogénesis en el CCR es la activación de la vía Wnt. Esto ocurre cuando la β -catenina (mediadora de esta vía) se une a sus receptores nucleares y da lugar a la transcripción de múltiples factores que activan la proliferación celular. El

gen APC actúa como supresor de tumores al frenar a β -catenina y permitir su degradación. Así, aquellas mutaciones germinales o somáticas de APC provocarán una activación continua de la vía Wnt. En tumores que presentan APC nativo suele producirse una mutación en β -catenina que genera resistencia a su propia degradación, activando pues la vía Wnt (69).

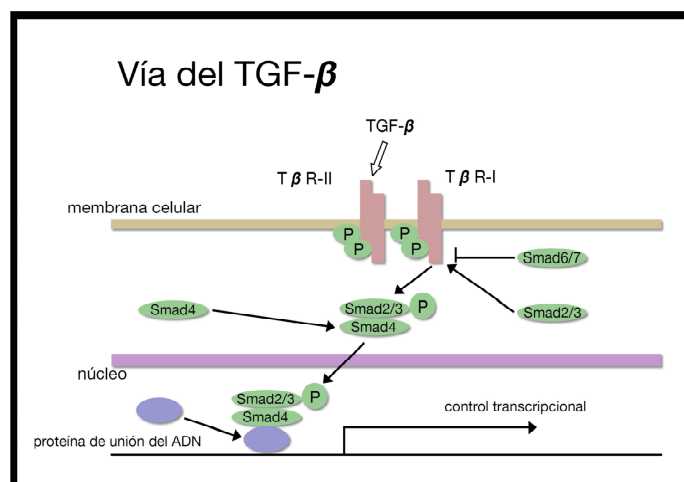
b. *Mutación de p53 (fig. 8)*: en condiciones normales, p53 media la detención del ciclo celular y controla la apoptosis. Su inactivación por medio de una mutación, genera una activación incontrolada del ciclo celular y una alteración en el programa de muerte celular programada (70)

Figura 8. Vía de p53



c. *Mutación de TGF- β (fig. 9)*: la alteración de esta vía está implicada en la transición adenoma \rightarrow displasia de alto grado \rightarrow carcinoma. Dicha vía puede verse alterada tanto por mutaciones como por delecciones (71).

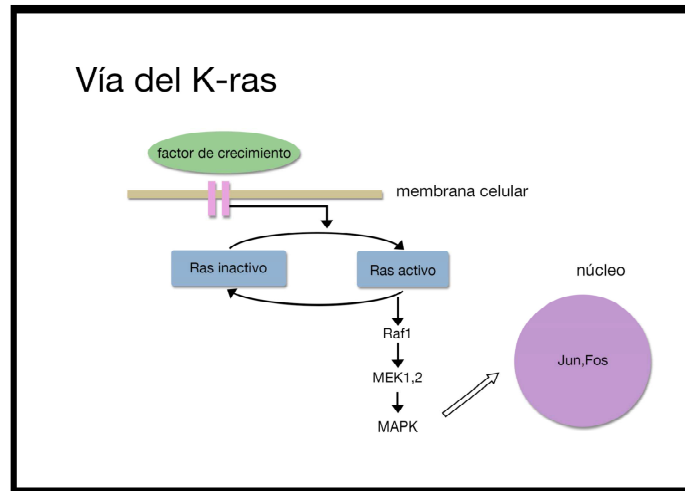
Figura 9. Vía del TGF- β



5. **Activación de vías oncogénicas:** estas vías son responsables de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Su activación incontrolada está implicada en el proceso de carcinogénesis CCR.

a. *Activación de la vía MAPK-cinasa (fig. 10):* mutaciones de genes como BRAF o RAS (en concreto, K-RAS), generan una activación incontrolada de esta vía (72).

Figura 10. Vía de K-RAS



b. *Activación de la vía PI3K:* Su activación por distintos mediadores está implicada en la transformación maligna de la mucosa colónica. Alteraciones genéticas menos comunes que están relacionados con esta vía son, la pérdida de PTEN (que inhibe PI3K) o la amplificación de AKT (que estimula PI3K) (73).

6. **Otras:** aunque hasta el momento hemos descrito las vías más conocidas de la carcinogénesis CCR, existen otras muchas que también juegan un papel importante:

a. *Aumento en la producción de prostaglandinas:* a través de una actividad aberrante de la enzima COX-2 implicada en la producción de prostaglandinas, principalmente E2. Esto ha permitido el desarrollo de estudios con moléculas inhibitoras de COX-2, que han proporcionado resultados variables (74).

b. *VEGF* (factor estimulante del crecimiento del endotelio): la formación de nuevos vasos es un proceso íntimamente implicado con el crecimiento y progresión tumoral de cualquier neoplasia. El conocimiento de esta vía ha permitido el desarrollo de fármacos que la inhiben y que han mejorado el tratamiento del CCR (75).

c. *EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico)*: la unión de EGF (factor de crecimiento epidérmico) a su receptor (EGFR) implica la activación de cinasas como MAPK y PI3K y por tanto, de la proliferación celular. Su conocimiento ha permitido el desarrollo de anticuerpos monoclonales, que permiten bloquear la progresión tumoral durante algún tiempo en el CCR diseminado (76).

d. *Papel de los estrógenos*: los estrógenos son hormonas esteroideas cuya función se realiza a través de la unión a los receptores estrogénicos (RE). Actúan a nivel de los órganos reproductores (estimulando la proliferación y diferenciación celular). Su implicación en cáncer ha sido ampliamente estudiada e incorporada, principalmente a la terapéutica del cáncer de mama pero parece que también tienen un papel en otras neoplasias como el cáncer de próstata o el CCR. En este último, estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que la terapia hormonal sustitutiva podría ejercer un papel protector frente al desarrollo de estos tumores. Además, ha sido descrito que el RE más abundante en la mucosa intestinal es el RE subtipo β (RE β) y no el RE subtipo α (RE α), contrario a lo ocurrido en el cáncer de mama.

Por tanto, son muchos y complejos los pasos que provocan la transformación celular y la adquisición del fenotipo maligno algunos más conocidos que otros pero todos con implicaciones notorias en dicho proceso sin los cuales, no podría llevarse a cabo la transformación de la célula tumoral.

3.2 Clasificación molecular del CCR

Dado que el CCR no parece obedecer a una única mutación o alteración génica, sino que pueden coexistir en el mismo paciente varias de ellas, resulta lógico suponer que el pronóstico y la evaluación del paciente puede variar dependiendo de las mutaciones o alteraciones que se detecten. La última década ha sido testigo de un importante avance en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares responsables del desarrollo y diseminación del cáncer colorrectal. Sin embargo, estos avances básicos no se han traducido en aplicaciones clínicas, y la mayoría de nuestras decisiones terapéuticas siguen basadas en las clasificaciones más descriptivas, basadas en la morfología e histopatología del tumor (51).

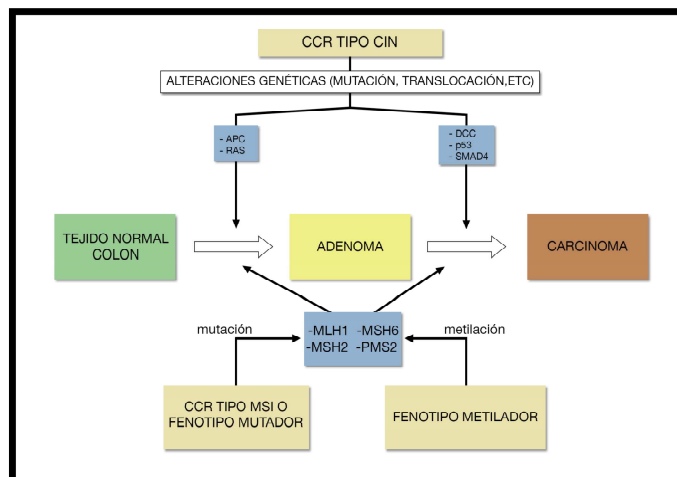
Aunque se han descrito distintos tipos de CCR desde el punto de vista histológico (adenocarcinoma, adenocarcinoma mucinoso, adenoescamoso, etc.), en los últimos años los avances en la investigación básica de este tumor han permitido diferenciar 3 tipos de CCR, que difieren principalmente en el proceso de carcinogénesis (77) (fig. 11):

1. **CCR tipo CIN (inestabilidad cromosómico o pérdida de la heterocigosidad):** en este tipo de tumor se engloban el 75-80% de los CCR, caracterizados por la alteración de múltiples genes como APC, DCC, K-ras o p53, que van a dar lugar, como ya hemos explicado anteriormente, al desarrollo tumoral. Este grupo de alteraciones constituyen la secuencia descrita por Fearon and Vogelstein en 1990.

2. **CCR tipo MSI o fenotipo mutador (inestabilidad microsatélite):** en este grupo se encuentran el 20% de los CCR y ellos se caracterizan por una anomalía del funcionamiento del *mismatch repair system* (sistema de reparación del DNA) que incrementa la inestabilidad genómica. Las características de este tipo de tumores son: a) suelen tener una presentación en colon derecho, b) aparecen en gente joven, c) son pobremente diferenciados, d) suelen ser mucinosos y e) tienen buen pronóstico. Los principales genes implicados son MLH1 (el más frecuente), MSH2, MSH6 y PMS2. La pérdida de expresión de estas proteínas determinada mediante inmunohistoquímica permite una valoración rápida y sencilla de este fenotipo (78).

3. **CCR fenotipo metilador:** el principal mecanismo epigenético relacionado con el desarrollo del CCR es la metilación de las islas CpG que se sitúan principalmente en los promotores de genes supresores tumorales. Existen diferentes estudios que han relacionado el perfil de metilación de diferentes genes con distintos tipos de CCR denominados CIMP: CIMP 1, CIMP 2 y CIMP negativo. Sin embargo, aunque los datos en la literatura apuntan hacia un CIMP 1 caracterizado por la metilación de distintos genes, principalmente de MLH1, el CIMP 2 presenta metilaciones de MINT2 y MINT27. No está claro cuáles son los marcadores óptimos para definir cada uno de los tipos de tumores (79). De manera resumida, en la siguiente figura se pueden recoger todos los cambios descritos hasta la fecha en el proceso de carcinogénesis dependiendo del tipo molecular de CCR.

Figura 11. Clasificación molecular del cáncer colo-rectal (77).

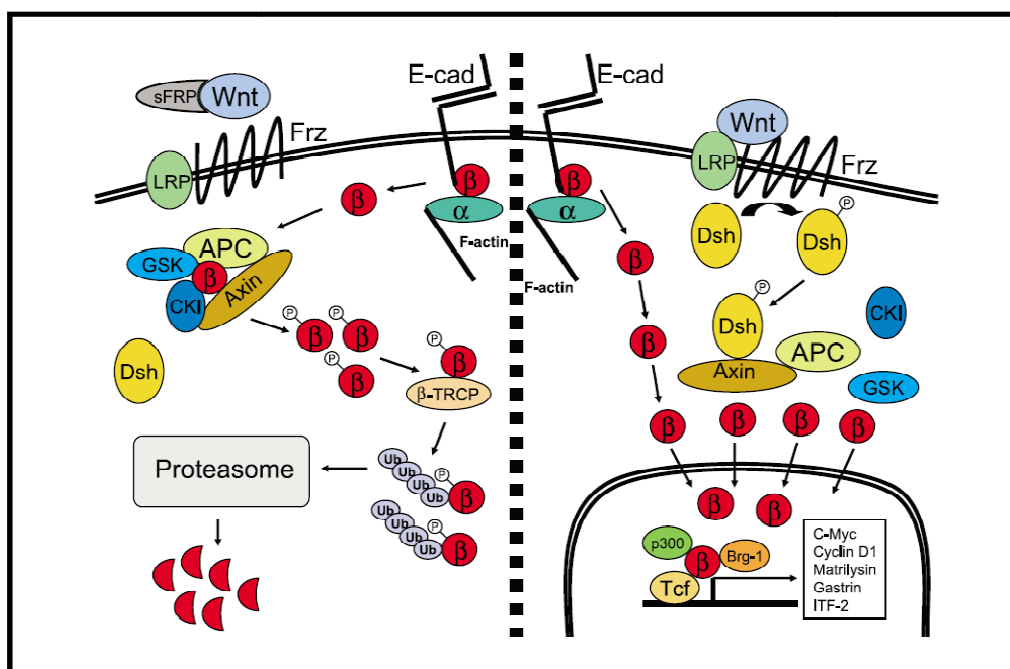


3.3 Importancia de la vía WNT en el CCR

La vía Wnt desempeña un papel clave en el desarrollo de tejidos y del cáncer (80,81). Originalmente fue descrita en la mosca del género *Drosophila* (82). El término "Wnt" se introdujo en la década de los 80, y su nombre hace referencia al producto de la fusión de dos genes, un segmento del gen de *Drosophila*, Wingless (Wg) e Int-1, un proto-oncogén de ratón (83). Las proteínas Wnts son una gran familia de al menos 19 glicoproteínas secretadas que juegan papeles clave en el control de la división celular (84).

El desarrollo de las investigaciones genéticas y bioquímicas han conducido a la comprensión global de la vía Wnt tal y como se conoce hoy en día. El estudio más amplio de esta vía se centra en la parte de la transcripción y activación de genes específicos, al cual nos referimos como la vía canónica de Wnt (fig. 12) (80):

Figura 12. Vía canónica de señalización de Wnt (80).



- Como podemos observar a la izquierda de la imagen, en condiciones fisiológicas, la fracción mayor de Beta-catenina (β) está obligada a unirse a cadherina E (E-cad) mediante moléculas de adhesión celular y con la alfa-catenina, quedando vinculada a la membrana celular y a la actina del citoesqueleto (85). Después de la fosforilación por caseína kinasa activa (CK1a), la β -catenina libre se

une obligatoriamente al complejo multiprotéico compuesto por: la proteína APC (poliposis adenomatosa coli), axina y/o su homólogo axina2/conductina, y glucógeno sintasa quinasa (APC / Axina / GSK3b); el cual la fosforila en la posición amino-terminal (la cinasa caseína 1a fosforila en el residuo serina 45 y la glucógeno sintasa quinasa 3b en los residuos serina/treonina 41, 37 y 33) (86,87,88). Tal fosforilación permite el reconocimiento de β -catenina por la β -TrCP, esta ligasa facilita la ubiquitinación y posterior degradación de β -catenina mediante el complejo proteosoma 26S. En ausencia de señal Wnt, Tcf se asocia con los co-represores para bloquear la expresión de los genes diana de Wnt.

- En la derecha de la figura observamos como las glicoproteínas secretadas en la vía Wnt (ligando Wnt) se unen con los miembros proteicos transmembrana de la familia “low density lipoprotein receptor-related protein family” (LRP) del tipo LRP-5 o LRP-6, que actúan como correceptores, activando el receptor de membrana con forma rizada “Frizzled receptor” (Frz). De esta forma, se forma un complejo de unión entre Frz, LRP y Wnt y actúan como mecanismo de mediación de la vía canónica de Wnt. El receptor Frz, a su vez interviene en la fosforilación de la proteína citoplasmática “Dishevelled” (Dsh). Tras la unión de Dsh a la axina del complejo APC / Axin / GSK, este se disocia y así β -catenina elude su fosforilación y degradación posterior. Después de la translocación al núcleo de β -catenina libre (por mecanismos aún desconocidos), esta no se une por sí misma al ADN, sino que se une al Factor de células T (Tcf) perteneciente a la familia de factores de transcripción humano (Tcf/LEF) y recluta a las proteínas de remodelación de la cromatina (p300 y Brg-1) para que se unan a promotores sensibles y activen de este modo la transcripción de genes diana específicos: c-myc, ciclina D1, matrilisina, gastrina, e ITF-2, que presumiblemente orquestan las manifestaciones fenotípicas de la activación de la vía Wnt/Wg. Tras lo cual, otras proteínas secretadas como WIF (“Wnt inhibitory factors”), cerberus y FrzB antagonizan la unión de Wnt con los receptores “frizzled”, mientras que Dickkopf (Dkk) inhibe la interacción Wnt/LRP. Otra proteína asociada a membrana; Kremen, se une a Dkk e induce la endocitosis de LRP, antagonizando así la señalización de Wnt. (80, 83,89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96).

La señalización a través de esta vía está presente durante la embriogénesis, donde se ha demostrado que regulan muchos eventos de desarrollo en organismos que van desde gusano al hombre (92). En el desarrollo del embrión vertebrado, la formación del eje dorsal-ventral depende la actividad de la vía Wnt. La desregulación de sus señales provoca defectos de desarrollo. Al igual que otras importantes vías que regulan la

morfogénesis en la embriogénesis temprana, hay estudios que muestran una alta frecuencia de mutaciones constitutivas activadoras de la señalización Wnt / β -catenina en tumores humanos, implicándose así en la génesis del cáncer (81).

El 70-90% de los cánceres colo-rectales tienen una mutación activadora de la vía canónica de Wnt (83, 97,98) que, en última instancia conduce a la estabilización y acumulación de β -catenina en el núcleo celular. Es más frecuente encontrar mutaciones en APC, pero hay un subconjunto de tumores con APC de tipo nativo o salvaje (“wild type”) que tienen mutaciones de β -catenina.

Se han determinado niveles altos de algunas proteínas Wnt en tejidos de distintas neoplasias, no sólo en el cáncer colo-rectal (84, 99, 100). Por lo tanto, la importancia epidemiológica de los cánceres asociados con defectos en la ruta de Wnt es evidente (80) y hace que el CCR sea un modelo atractivo de intervención molecular (83).

- β -catenina: el oncogén central de la vía Wnt

La β -catenina se ha implicado en multitud de neoplasias humanas y su potencial oncogénico ha sido ampliamente estudiado en modelos in vitro de cultivo de tejidos y en modelos in vivo de animales (80).

La β -catenina se identificó, por primera vez, a raíz de su unión con el dominio citoplásmico de la proteína de adhesión celular E-cadherina. En condiciones fisiológicas la mayor cantidad de β -catenina está unida a E-cadherina y este proceso se regula por tirosina quinasas y tirosina fosfatasas (80,82). La acción de la tirosina fosfatasa conduce a su disociación de las uniones adherentes y a su transferencia al citosol (101). Como se ha descrito anteriormente, en ausencia de una señal Wnt, la β -catenina libre es fosforilada y degradada.

Numerosos estudios han confirmado la existencia de un pool citosólico y nuclear de β -catenina y revelaron su papel en la activación transcripcional como principal mecanismo de la vía canónica Wnt (86,102).

La β -catenina tiene dos funciones distintas, a saber, el mantenimiento de la adhesión celular y la mediación en la vía de transducción Wnt / β -catenina. Las propiedades oncogénicas de Wnt / β -catenina se debe a la alteración en la degradación de proteína dependiente de la fosforilación. El complejo β -catenina/Tcf facilita la transcripción de genes diana que codifican para la activación de efectores de la proliferación celular, la invasión y la inhibición de la apoptosis, lo que lleva al desarrollo del cáncer colorrectal. Además, en el frente de invasión tumoral, la β -

catenina estabilizada y activada interactúa con otras vías moleculares para facilitar la progresión del tumor (86).

Los eventos moleculares implicados en el inicio y la progresión metastásica del CCR no están del todo aclarados. Pero parece evidente que la vía Wnt y su principal mediador, β -catenina, juegan un papel crítico en la patogénesis de la poliposis familiar adenomatosa y en una proporción de los CCR esporádicos (102).

Las mutaciones en el gen que codifica la β -catenina (CTNNB1) están presentes en el 10% de los CCR, aproximadamente (83). Las mutaciones en APC y CTNNB1 son mutuamente excluyentes, y tienen más o menos el mismo efecto sobre la estabilidad de β -catenina y la transactivación de Tcf. Sin embargo, los adenomas pequeños con β -catenina mutada no parecen ser más propensos a progresar a grandes adenomas y carcinomas invasivos (83).

La mayoría de las mutaciones de β -catenina se producen en o alrededor del exón 3 del gen CTNNB1, afectando los puntos de fosforilación para GSK3b, por lo que se hace refractaria a la degradación (103). También se han encontrado mutaciones inactivantes de axina en unas pocas líneas celulares de CCR (104). Todo esto en conjunto, parece indicar que cualquier mutación que conduce a la estabilización nuclear de β -catenina es suficiente para la transformación neoplásica en la mucosa colónica (83).

Sharma et al (154), sugieren que mientras que la expresión de β -catenina en las células intestinales induce genes que promueven la proliferación, en los timocitos induce la expresión de genes (oncogenes) asociados a la senescencia (“oncogene-induced senescence”, OIS), a la detención del crecimiento y la apoptosis dependiente de p53. Correlacionaron el patrón de expresión de β -catenina con el rol que juega en el desarrollo de cada tejido, y sugirieron que la susceptibilidad de transformación neoplásica por β -catenina está relacionada íntimamente con su función durante el desarrollo.

La β -catenina asociada a membrana es generalmente una proteína estable.

En presencia de una señal de Wnt, la β -catenina ya no se degrada (estabilizada) y se transloca al núcleo donde promueve la transcripción de varios genes diana implicados en la proliferación celular (90). Además, la disminución de la adhesión celular mantiene la señalización de Wnt, estimulándose la migración celular y la formación de metástasis (90).

No obstante, estudios recientes sugieren que otros mecanismos y/o otras vías alternativas (vía Wnt no-canónica), pueden ser responsables de una mayor agresividad tumoral y de peor pronóstico (105).

Los estudios de Caldwell et al (106, 107,108) han establecido que los antagonistas de la vía Wnt se regulan a la baja en las primeras etapas del cáncer colorrectal, presentándose las células neoplásicas en un microambiente donde las señales del factor de crecimiento de Wnt no se encuentran moduladas.

Se ha demostrado que los ligandos Wnt influyen en la actividad de β -catenina, cuando una mutación en esta provoca la pérdida de control. Pero la vía Wnt no parece que influya tanto cuando hay presencia de mutaciones en APC (109), que son más comunes en la enfermedad esporádica. Wnt puede, sin embargo, provocar también respuestas a través de una vía alternativa (no canónica), β -catenina-independiente, empleando los mismos receptores FZD. Así, Caldwell et al (108) demostró que las proteínas NKD1, FZD3 y FZD6 están inducidas significativamente en los adenomas colo-rectales (en comparación con el tejido normal), indicando que las vías alternativas Wnt/PCP y Wnt/Ca²⁺ están expresadas en los estadios tempranos de la formación tumoral (109). Esta vía de señalización Wnt β -catenina-independiente puede proporcionar nuevas dianas para quimio-prevención de los primeros estadios de tumores colo-rectales.

**- Iniciación del CCR: implicaciones de las alteraciones de la vía Wnt.
Papel de la β -catenina**

La activación de la vía de señalización Wnt puede conducir a una amplia variedad de resultados, incluidos los efectos sobre la transcripción, la migración y la polaridad celular (110). Se espera que el espectro de genes diana controlados por β -catenina/Tcf contenga la clave para entender la transformación primaria de unas células intestinales en otras. Una vez que la activación de ciertos genes diana críticos proporcione una ventaja de crecimiento, se debe adquirir un número de mutaciones de inactivación en los genes supresores tumorales (83). En células de CCR, esto se logra con mayor frecuencia mediante inestabilidad cromosómica.

Los cambios arquitectónicos junto con la supresión de la diferenciación celular en la cripta intestinal pueden proporcionar una oportunidad para que se produzcan estas mutaciones adicionales. Los cambios en la adhesión celular y la migración contribuyen a la invasión de un tumor en particular. Todos estos requisitos se cumplen mediante la activación de la vía de señalización Wnt (83) y son brevemente explicados a continuación:

Se han identificado varios genes diana individuales de Tcf / LEF, algunos de los cuales tienen importantes implicaciones en la comprensión del papel de la señalización de Wnt en el cáncer. Entre ellos, el más frecuente, es la promoción de la expresión de c-MYC (83) (tabla 6).

Tabla 6. Genes diana de β -catenina/TCF (83).

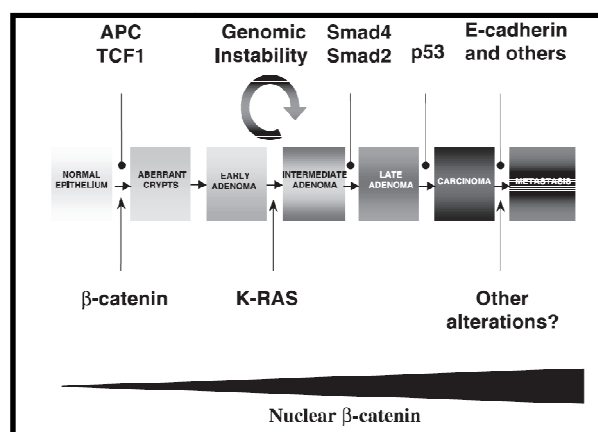
| Gene |
|---|
| <i>CD44</i> |
| <i>BMP4</i> |
| <i>claudin-1</i> |
| <i>ENC1</i> |
| <i>cyclin D1</i> |
| <i>fra-1</i> |
| <i>PPARδ</i> |
| <i>c-MYC</i> |
| <i>Nr-Cam</i> |
| <i>ITF-2</i> |
| <i>IL-8</i> |
| <i>PKD1</i> |
| <i>Gastrin</i> |
| <i>ATN2</i> |
| <i>MRD1</i> |
| Matrilysin |
| <i>MMP7</i> |
| Osteopontin |
| <i>TLE/Groucho, MSX1, MSX2, CBP/p300, REST/NRSF</i> |
| <i>EPHB2, EPHB3, c-MYB, ETS-2, BMP4</i> |

Una característica común a muchos tumores es la inestabilidad genética, a menudo se manifiesta como aneuploidía o hiperploidía, centrosomas supernumerarios y formación de un huso mitótico anormal (111). Estos fenómenos dan lugar a divisiones celulares multipolares y a la segregación cromosómica incompleta o anormal.

Una célula normal, para desarrollar un cáncer, necesita cumplir con dos requisitos esenciales: debe adquirir ventaja selectiva para permitir la expansión inicial clonal; y adquirir la inestabilidad genética que permita múltiples golpes ó “hits” en otros genes, permitiendo así la progresión del tumor y la transformación maligna (83).

La mayoría de los tumores resultantes de la vía Wnt activada cumplen el primer requisito activando genes diana de Tcf tales como c-MYC. El cumplimiento del segundo requisito ha sido el mejor estudiado en el colon, ya que el CCR se desarrolla a través de una serie de alteraciones genéticas que involucran la acumulación de mutaciones secuenciales en una serie de genes (KRAS; la delección del cromosoma 18q que afecta a los genes SMAD2 y SMAD4; p53, E-cadherina, etc.) y la progresión a través de la secuencia adenoma-carcinoma (fig. 13) (83).

Figura 13. Secuencia molecular adenoma – carcinoma. Expresión de β -catenina (modificado de Vogelstein) (83).



En el CCR esporádico, la frecuencia de mutaciones en APC ronda el 60%, provocándose una disminución de la degradación de la β -catenina, causando su traslocación al núcleo (112).

Aunque el 40% de los CCR con MSI contienen APC no mutada (“wild type”), portan otros defectos en la vía Wnt que causan igualmente estabilización de β -catenina y aumento de su actividad (por ejemplo, mutaciones dominantes en el exón 3 del gen de β -catenina, o en el gen supresor tumoral conductina/axina-2) (112).

No obstante, en la mayoría de los CCR esporádicos se ha detectado un alto grado de MSI, lo cual se correlaciona con frecuencias bajas de mutaciones de APC y β -catenina, y mejor pronóstico; mientras que la inestabilidad cromosómica (CIN) se asocia con peor pronóstico y con disfunción de la vía Wnt (expresión de β -catenina nuclear alta) (113,114,115).

1. APC y β -catenina en la adhesión y migración celular

El hecho de que APC y β -catenina se unan a la actina y a los sistemas microtubulares del citoesqueleto son indicativos de un papel fundamental en la migración celular. Además, mutaciones en APC dan como resultado una concentración incrementada de β -catenina en la membrana, el aumento de la adhesión y, en consecuencia, una disminución de la migración (116). A su vez, las mutaciones en β -catenina también afectan a las propiedades de adhesión celular, ya que no se une correctamente a E-cadherina (117).

2. Cáncer mediado por WNT: vulnerabilidad según el tipo celular

Las células de los “pockets” intervallosarios del intestino en desarrollo (las futuras criptas) expresan TCF4 y β -catenina nuclear (118). Microarrays de ADN han demostrado que los patrones de la expresión de genes en células de pólipos se asemejan a la de la proliferación de células criptales, lo que sugiere que la cascada de Wnt podría estar activa en el epitelio del colon adulto normal y que la expresión de β -catenina puede persistir en los núcleos de las células en la tercera parte inferior de las criptas intestinales adultos normales (119).

Además, la tinción inmunohistoquímica de β -catenina nuclear sugiere que la señalización de β -catenina / TCF en el tejido adulto normal es considerablemente menor que la observada en pólipos intestinales o colónicos, se asume, por tanto, cierta cantidad de tinción de β -catenina nuclear (119).

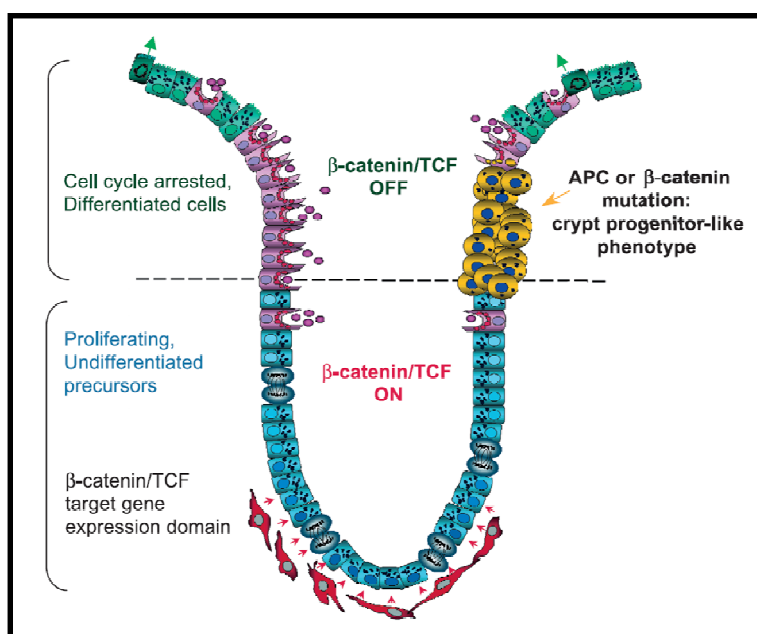
Por lo tanto, si la señalización de Wnt está activa y presente en algunos tejidos, las alteraciones que simplemente aumenten la señal pueden ser suficientes para instigar el crecimiento celular incontrolado (83, 119).

3. Cambios arquitecturales en la cripta intestinal

La vía de Wnt parece regular el complejo equilibrio existente entre la proliferación, migración y diferenciación, esencial para el funcionamiento normal del epitelio intestinal que prolifera rápidamente. Cualquier alteración que modifique este equilibrio favorece el desarrollo tumoral.

La mucosa colorrectal contiene un gran número de invaginaciones denominadas criptas de Lieberkühn. Las células epiteliales se renuevan constantemente en estas criptas en un serie coordinada de eventos que implica la proliferación, la diferenciación y la migración de células hacia el lumen intestinal (fig. 14) (119).

Figura 14. Proliferación, diferenciación y migración celular en glándula intestinal (119).



Las células madre pluripotentes parece ser que residen en las posiciones inferiores de la cripta (acumulando β-catenina nuclear). A partir de estas células madre, se generan progenitoras que ocupan el tercio inferior de la cripta (compartimento de amplificación). Las células de este compartimento se dividen aproximadamente cada 12 h, hasta que su migración les trae a la región media de la cripta. Aquí dejan de proliferar y se diferencian en uno de los tipos celulares funcionales del colon (inhibiéndose la actividad β-catenina/Tcf). En el epitelio superficial, las células se someten a la apoptosis y / o la extrusión en el lumen. Las mutaciones en APC o β-catenina dan como resultado un compartimento proliferativo más amplio y extendido, y reduce la renovación celular del epitelio intestinal normal. Tal vez, proporcionando así un mecanismo temprano para la progresión de la enfermedad: un número mayor de células en este compartimento sensibles a un segundo "hits" (83).

Se ha descrito una correlación entre la expresión de β -catenina y la localización celular, con el pronóstico de distintos tumores gastrointestinales. Se ha observado que una tinción de β -catenina citoplasmática fuerte o nuclear en cáncer colo-rectal se correlaciona con un mayor crecimiento invasivo tumoral, una mayor susceptibilidad de recurrencia de la enfermedad tras la cirugía, y una tasa de supervivencia más baja (17, 120, 121). Por otra parte, la detección sistemática de β -catenina nuclear ayudaría a definir los perfiles moleculares de los distintos tipos de tumores (83).

Además de los cánceres colo-rectales, los tumores malignos del hígado son los tumores gastrointestinales con la segunda incidencia más alta de mutaciones en la vía Wnt. En los hepatocarcinomas, la vía Wnt se puede activar a través de cualquiera de las dos mutaciones: β -catenina (122) o Axina (123). Aproximadamente el 20-30% de los carcinomas hepatocelulares son portadores de mutaciones en uno de estos dos genes (103), produciéndose así una desregulación de la señalización de Wnt.

Con respecto al cáncer de esófago; se ha detectado la sobreexpresión de FzE3 en los de tipo escamoso, lo cual se correlaciona con una traslocación nuclear de β -catenina; esta también se ha visto en el esófago de Barret (precursor de adenocarcinoma), pero no se han detectado aún mutaciones de β -catenina per sé (124,125).

En el cáncer gástrico de tipo intestinal también se han identificado mutaciones de β -catenina, sin embargo no se han encontrado en el cáncer gástrico de tipo difuso (126).

La β -catenina parece jugar un papel de menor importancia en la génesis de los tumores del páncreas. Sin embargo, se ha descrito que tres entidades raras; como neoplasias pancreáticas: pancreatoblastomas; carcinomas de células acinares; y tumores sólidos pseudopapilares; son portadoras con frecuencia mutaciones en los genes β -catenina o APC (127, 128, 129).

También las mutaciones de β -catenina se suelen producir en tumores ginecológicos: el carcinoma de endometrio (130) y carcinoma endometriode del ovario (131). En las neoplasias de la piel, como el melanoma (132); en el carcinoma anaplásico de tiroides (133), el cáncer de próstata (134), tumor de Wilms (135), cáncer de pulmón (136) y el meduloblastoma (137).

- Progresión del CCR: importancia de la β -catenina

Las propiedades oncogénicas de β -catenina dependen de su estabilización y localización subcelular en las células alteradas (86).

Múltiples factores regulan de forma estricta las funciones de expresión, degradación o estabilización, y la transcripción de β -catenina. Estos factores consisten en distintas moléculas que trabajan en diferentes niveles de regulación de la cascada de señalización, la degradación de β -catenina, la activación de GSK3b y la función

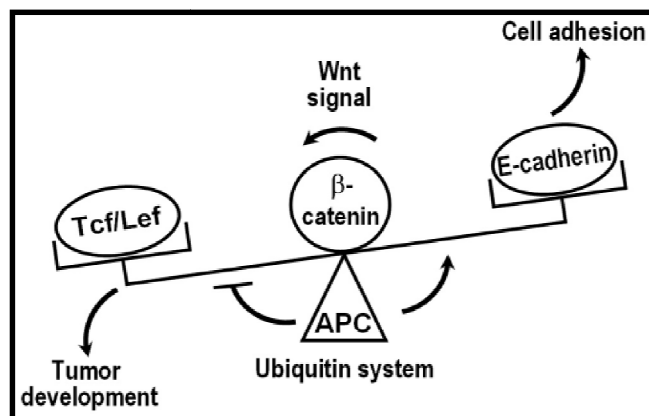
transcriptora de Tcf / LEF, respectivamente (84, 86, 99, 100). Teóricamente, las alteraciones en cualquiera de los factores o mecanismos que regulan estas vías de transducción de señales podrían resultar en la transformación neoplásica. De hecho, algunos de estas aberraciones ya se han identificado en el desarrollo del CCR.

Irónicamente, los elementos de la vía Wnt, por si mismos, rara vez participan en la activación de la vía durante la carcinogénesis. Las mutaciones más frecuentes que imitan la estimulación general de Wnt son: a) las mutaciones que inactivan el gen APC, b) mutaciones que inactivan el gen de la axina, y c) las mutaciones que activan la β -catenina. Dando todas ellas como resultado la estabilización de β -catenina (falta de degradación), el cúmulo nuclear y la activación de genes implicados en la proliferación celular. De estas, la más común es la inactivación mutacional de la APC, la cual se detecta frecuentemente como un evento temprano (86, 89, 138, 139, 140).

La alteración en la localización subcelular de β -catenina es otro mecanismo importante, ya que la disociación de β -catenina de la membrana celular interfiere en las funciones de la E-cadherina (adhesión celular y supresión tumoral), ya que forman una pareja mecánica y funcional en la maquinaria de adhesión celular. Los factores proto-oncogénicos que liberan la β -catenina del complejo de adhesión celular incluyen Ras, factor de crecimiento epidérmico (EGF), c-erbB-2 y c-Met (86, 141, 142).

Es importante destacar que se ha observado en el CCR de humanos y roedores un efecto sinérgico entre la progresión de los defectos en la adhesión celular mediada por E-cadherina y la activación de la transducción de señal mediada por β -catenina. (143). El papel de la β -catenina proto-oncogénica en la progresión tumoral depende del balance entre la adhesión celular y la transducción de señales mediada por β -catenina y APC (fig. 15) (86).

Figura 15. Rol de β -catenina y APC en la transformación celular (86).



El conocimiento de los mecanismos moleculares que transfieren la β -catenina desde su posición asociada a la membrana, al citoplasma y el núcleo, es esencial para comprender las funciones oncogénicas de la β -catenina estabilizada, que siguen siendo en gran parte desconocido (144).

La galactina – 3 es una proteína implicada en la promoción de la invasión tumoral y metástasis que, como la β -catenina, se transloca (mediante la fosforilación) entre el núcleo y el citoplasma. Recientes estudios han demostrado que la galactina – 3, colocalizada con la β -catenina en el núcleo, estimula la transactivación (a través de b-catenina/Tcf) de Ciclina D1 y c – myc, lo cual demuestra su función potencial en el reclutamiento de β -catenina (apartándola de la adhesión celular e implicándola en las vías de señalización) (86, 145).

3.4 Interacciones de β -catenina con otras vías moleculares

Un número creciente de genes diana emergentes transactivados por el complejo β -catenina/Tcf contribuye a la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, y crecimiento tumoral y progresión.

Aparentemente, la mutación somática en un solo gen “per se” no es suficiente para producir la transformación celular, la co-segregación de un gen mutante con otros oncogenes y genes supresores de tumores adquiere un lugar de importancia en las células que alcanzan un fenotipo neoplásico (86).

Por lo tanto, junto con la transactivación de los genes diana, la interacción con diferentes eventos moleculares y las cascadas de señalización se constituye una vía integral hacia la génesis tumoral, llevada a cabo por la β -catenina oncogénica.

Algunas de las vías moleculares involucradas en la interacción con β -catenina son:

- La vía de señalización Ras: esta vía puede activar la señalización de β -catenina mediante dos formas; la tirosin-fosforilación de β -catenina, lo cual impide la formación de un complejo de adhesión a membrana con cadherina-E; y mediante la inducción de la proteína Kinasa B (PKB/Akt), la cual fosforila e inactiva la GSK3b y esta, estando inhibida, no puede impedir la señalización de β -catenina (fig. 16) (146).

- La vía mediada por el factor de crecimiento transformante beta (TGF-b): El TGF-b promueve la fosforilación de Tcf-4, lo cual impide la formación de b-catenina/Tcf-4. Esto sugiere, la presencia de una interacción negativa (o neutralización) entre el TGF-b y el b-catenina/Tcf en las vías de señalización del CCR (147).

- La vía de Kinasa ligada a integrina (ILK): La ILK es una proteína Kinasa identificada a través de su interacción con la subunidad beta-1 integrina y regula la adhesión celular mediada por integrina, la expresión de E-cadherina y el ensamblaje a la matriz extracelular. En diversos estudios, se demuestra que activa PKB/akt; inactiva GSK3 β e inhibe la expresión de E-cadherina. Afectando así a la migración celular, al ciclo y la supervivencia tumoral (fig. 17) (148).

- La vía de interacción con NF- κ B: Este mecanismo contribuye a una retroalimentación negativa que regula β -catenina/Tcf y la interacción entre β -catenina/Tcf y la vía de señalización NF- κ B en las células no estimuladas. Un deterioro en la retroalimentación negativa de β -catenina en las células tumorales permitiría la transcripción de β -catenina/Tcf, dando como resultado un incremento en el potencial maligno del CCR (149).

Figura 16. Interacción de β -catenina con la vía de señalización Ras (146).

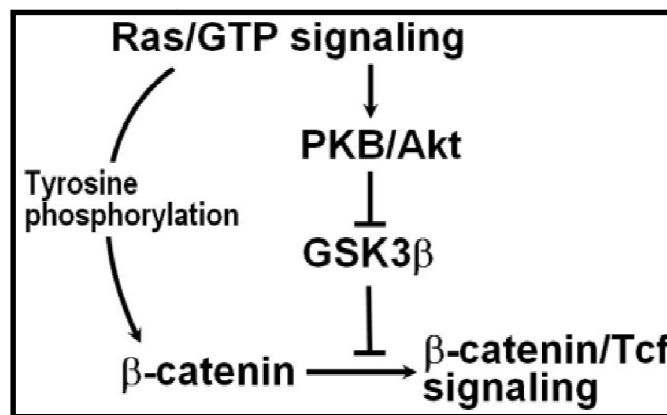
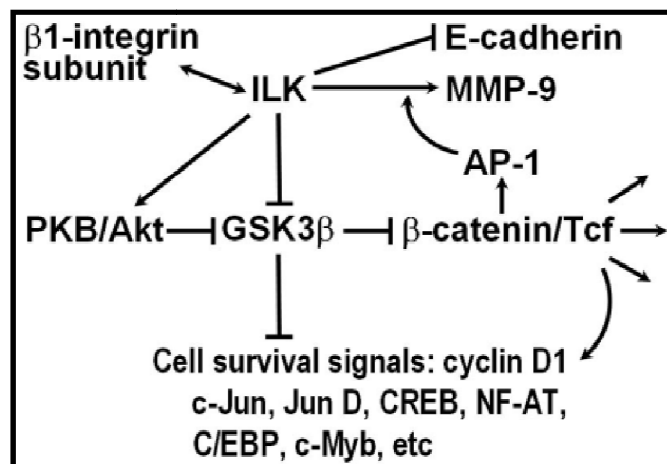


Figura 17. Interacción de β -catenina con la vía de señalización ILK (148).



Independientemente de las variaciones en el mecanismo de activación, la translocación de β -catenina del citoplasma al núcleo es una característica de su actividad oncogénica. Por lo cual, todas las mutaciones activantes de la vía Wnt se manifiestan con un solo defecto molecular: acumulación de β -catenina nuclear (83). Este fenotipo se detecta fácilmente en las neoplasias por métodos inmunohistoquímicos (150) y su activación a nivel nuclear representa un evento temprano en CCR (151).

Estudios recientes han demostrado tinción nuclear de β -catenina sólo en las células situadas en el frente invasivo del tumor. Esto se ha atribuido a una regulación transcripcional de β -catenina inducida por factores del microambiente tumoral. Debido a que estos tumores presentan una distribución heterogénea de la proteína en el resto de la lesión, se ha propuesto que estímulos diversos puedan afectar a las concentraciones de β -catenina y a su localización. Además, una tinción nuclear de β -catenina heterogénea se ha asociado con un pronóstico diferencial en el CCR (152, 153, 154).

Otros autores han demostrado que una proporción de los cánceres colo-rectales tienen expresión de β -catenina reducida o ausente, relacionándose con una mayor frecuencia de metástasis y peor pronóstico, lo cual apoyaría la hipótesis de que las vías alternativas juegan un papel importante en la génesis tumoral del colon (140, 155). Sin embargo, no detectaron diferencias en la tinción nuclear de β -catenina entre los tumores primarios y sus metástasis, lo que podría indicar que los fenómenos que provocan la translocación de la proteína al núcleo pueden tener un papel en la iniciación tumoral, pero no en su progresión (140, 153).

En cuanto a las variables clínicas normalmente estudiadas (sexo, edad, localización, tamaño tumoral, diferenciación, TNM, etc.), Pancione et al. tan sólo encontraron correlación significativa entre β -catenina, la localización tumoral y el estadio de Dukes (155). Estos datos se corroboran con otros de la bibliografía (115, 156, 157, 158), como los de Martesson et al (115), quienes describieron que el estadio tumoral de Dukes B se asocia con la expresión nuclear de β -catenina y un peor pronóstico, así como que la negatividad de β -catenina nuclear se correlaciona con una localización derecha. Sin embargo, Roca et al (159) publicaron unos resultados contradictorios.

Existen estudios que afirman que el porcentaje de frente invasivo de tipo infiltrante (con gemación o “budding”) se asocia con un mayor riesgo de muerte en el CCR (160) y que este tipo de frente probablemente refleja un comportamiento tumoral asociado a la capacidad invasiva (161). Con respecto a esto, se ha demostrado que la β -catenina se expresa principalmente en el margen invasivo en la mayoría de los CCR y parece que esto se correlaciona con la cantidad de gemación (113). Análogamente, la

acumulación de β -catenina nuclear en esas gemaciones o brotes celulares (“budding”) del frente invasivo de tipo infiltrante podrían proporcionar a las células tumorales la capacidad de separarse, migrar y difundir (112,115).

- Relación entre β -catenina y la expresión de p53

El origen múltiple del proceso tumoral es un modelo bien establecido, en el cual muchas alteraciones genéticas y epigenéticas ocurren a diferente tiempo, contribuyendo a la iniciación y progresión tumoral.

El gen TP53 humano codifica una proteína nuclear que induce la detención del ciclo celular, la apoptosis, la senescencia celular, y la diferenciación en respuesta a señales de estrés endógenas y exógenas (162). Las células normales expresan niveles bajos de p53 y su degradación está mediada por MDM2 y otras ligasas (COP-1 y PIRH-2). TP53 es un objetivo de mutaciones muy frecuentes en más de 50% de los cánceres humanos, incluyendo CCR (163). La mayoría de las mutaciones de p53 conllevan un aumento de la estabilidad proteica (ausencia de degradación) y la acumulación en los núcleos de las células tumorales.

La eliminación de la capacidad de supresión tumoral de TP53 parece ser un requisito previo para la conversión de células transformadas del epitelio colo-rectal en un tumor maligno. Curiosamente, las mutaciones de p53 ocurren relativamente tarde durante el curso de la carcinogénesis colo-rectal.

Baker et al. (164) sugirieron que en la carcinogénesis colo-rectal se produce una mutación de sentido erróneo en un alelo del gen p53, lo cual confiere una ventaja proliferativa en esas células, dando origen a adenoma pero sin desarrollar un fenotipo completo de cáncer. La eliminación posterior del TP53 restante de tipo salvaje (producida por la eliminación de una parte o de todo el alelo opuesto), como un segundo evento mutacional, elimina la restricción final de transformación completa que da lugar al carcinoma. Este segundo evento mutacional del gen TP53 se produce en las últimas etapas de la progresión tumoral.

La proteína supresora tumoral p53 es una de las dianas inactivadas más frecuentes en el cáncer (165, 166, 167). La presencia de una proteína p53 funcional de tipo nativa o salvaje (wt) protege contra la aparición de células con propiedades de crecimiento desreguladas (que puedan dar lugar a cáncer). La proteína p53 sirve para mantener la estabilidad genómica mediante la eliminación de las células con daño genómico del “pool proliferante”, así como por facilitar la reparación de tales daños. El mecanismo subyacente implica la activación de p53 en respuesta a la detección de daño genómico, lo que lleva a la acumulación de p53 bioquímicamente activa dentro del núcleo (normalmente, p53 se mantiene a muy bajos niveles debido a la continua degradación a

través de la vía ubiquitina-proteasoma, esta degradación es muy dependiente en la oncoproteína Mdm2 (168). Un aumento en la actividad de p53 puede dar lugar a una variedad de consecuencias biológicas, sobre todo la detención del ciclo celular en G1 y / o G2 y la inducción de la apoptosis la muerte celular. Además de en estos casos, la activación de p53 también puede producirse en respuesta a la presencia de oncogenes desreguladores (ras y c-myc), evitando así que se desarrolle el cáncer (169, 170). Al igual que la ruta de APC / β -catenina, p53 es también una diana común de alteraciones genéticas en el cáncer colo-rectal (62).

Esta sobreexpresión nuclear de p53 se puede estudiar por métodos inmunohistoquímicos, pero la distribución tisular suele ser heterogénea (lo cual indicaría una baja sensibilidad del método). No obstante, se han encontrado evidencias de heterogeneidad topográfica de inmunotinción de p53 nuclear en algunas neoplasias (p.e. en el carcinoma urotelial músculo-invasivo; carcinoma de células de Merckel, etc.), donde tiende a concentrarse en el compartimento profundo del tumor (asociándose a una sobreexpresión de bcl-2 y una disminución de la apoptosis), sugiriendo así que pueda representar la consecuencia de una selección celular tumoral (171, 172, 173).

A su vez, la presencia de p53 nuclear incrementada se relaciona con la afectación ganglionar, las metástasis a distancia y un peor pronóstico, no obstante, la importancia clínica de esta sobreexpresión sigue siendo controvertida (174).

Se ha descrito una interacción entre la β -catenina y p53, parece que la sobreexpresión de β -catenina puede promover la acumulación de p53, aumentando su potencial de transactivación (62).

La estabilización de p53, a su vez, regula a la baja la β -catenina (aumentando su degradación proteosomal vía GSK3-dependiente/independiente) mediante un mecanismo de “feed-back” negativo. (175,176). Sin embargo, los enlaces moleculares entre β -catenina y p53 en CCR con progresión metastásica son todavía desconocidos.

Para estudiar la posibilidad de una relación causal entre la activación aberrante y temprana de la señalización dependiente de β -catenina y la inactivación posterior de p53 durante la carcinogénesis, Damalas et al (62) investigaron los efectos de desregulación de β -catenina sobre los niveles de p53 y su actividad transcripcional; ellos postularon que la sobreexpresión forzada de β -catenina pudiera imitar la activación oncogénica de esta proteína, induciendo la acumulación de p53 activa. Por lo tanto, la acumulación aberrante de la β -catenina libre, podría eventualmente desencadenar una respuesta inhibidora tumoral de p53 (62).

La oncoproteína Mdm2 es una proteína reguladora de p53 (se une a ella para una degradación proteosomal rápida). El gen MDM2 es una diana para la activación transcripcional por p53, estableciendo de ese modo un bucle de retroalimentación negativa que mantiene p53 bajo control. La sobreexpresión de β -catenina produce una protección significativa contra la regulación a la baja por Mdm2, ya que interfiere en la degradación.

Damalas et al (62) establecieron que la sobreexpresión de β -catenina puede promover una acumulación de p53 competente funcionalmente. Esto parece producirse a través de la habilidad de la β -catenina excedente para interferir en la degradación proteosomal normal de p53 (a través de una combinación de al menos dos mecanismos, uno que implica la protección contra Mdm2 mediada por proteólisis y el otro presumiblemente operando a través de una alternativa actualmente indefinida). Así, una sobreexpresión aberrante de β -catenina se puede calificar como otra señal estresante que desencadene una respuesta celular de p53, siendo el mecanismo subyacente más probablemente de tipo indirecto (en ausencia de una evidencia de asociación física directa entre p53 y β -catenina) (62). Las células sometidas a un aumento aberrante de β -catenina libre, lo que resulta por ejemplo, de las mutaciones en APC (pérdida de la función) o de β -catenina en sí misma, pueden responder regulando al alza p53 en estadios iniciales de tumores colo-rectales (p53 estabilizada). Este aumento de p53 restringiría la proliferación tumoral, proporcionando una función supresora tumoral (presión selectiva para la inactivación mutacional posterior de p53) y, como consecuencia de otras alteraciones genéticas asociadas a la progresión tumoral, se produciría una activación de dicha p53. Tal escenario podría explicar la aparición tardía de mutaciones de p53 en el cáncer colo-rectal (62).

Al igual que otros autores, Levina et al (175), investigaron los mecanismos moleculares que subyacían en la regulación negativa de β -catenina por interacción con p53. Descubrieron que la p53 está implicada en la fosforilación de β -catenina (en los extremos NH2 de las serinas 33 y 37) y para ello requiere la actividad de CK1 y GSK-3b. Por lo tanto, las mutaciones en estos extremos NH2-serinas bloquea la capacidad de p53 para mejorar el “turnover” por fosforilación de β -catenina, haciéndola resistente a p53.

Además, p53 induce una movilización más rápida de Axina en el complejo de degradación multiprotéico, mejorando así el “turnover” del volumen de β -catenina citosólico, como parte de un mecanismo de protección contra el desarrollo del cáncer.

Watcharasit (177) et al, sugirió que la activación de p53 es el resultado de una interacción directa y activación de GSK3b, y una disminución del nivel de β -catenina en el núcleo celular.

En conclusión, se ha demostrado la existencia de un bucle automático regulador en el que un exceso de β -catenina puede inducir una acumulación de p53 activa, que a su vez conduce a una regulación a la baja de los niveles de β -catenina (62,176). La activación de p53 por estrés genotóxico o por su sobreexpresión conduce a un aumento en la degradación de β -catenina por el sistema ubiquitina-proteosoma (178, 179, 180).

Este bucle de control puede servir como un medio eficaz para frenar los efectos oncogénicos de la β -catenina desregulada. Por lo tanto, su alteración puede dar rienda suelta a la actividad oncogénica de β -catenina, lo que contribuye a la progresión del tumor. La alteración de esta regulación automática puede producirse a través de mutaciones en el gen p53; que podría incapacitar la inhibición sobre la actividad de la β -catenina.

Es de interés que, mientras que la mutación de p53 predomina en casi todos los cánceres colo-rectales, esta mutación es infrecuente en los CCR que tienen mutaciones de β -catenina de forma directa (181,182).

Al analizar la expresión de p53 y β -catenina en el mismo tumor, se ha evidenciado que el subgrupo con negatividad para β -catenina y positividad nuclear de p53 está estrechamente relacionado con las metástasis a distancia y con una supervivencia corta (en comparación con los otros subgrupos de inmunoexpresión) (155). Esto concuerda con estudios in vitro, donde se ha demostrado que las vías de β -catenina y p53 se co-regulan entre sí mediante “feed-back” negativo, ya que una acumulación de β -catenina puede servir de estímulo para la activación de p53 a través de la interacción con p14ARF y MDM2 (163). Por el contrario, una p53 “wild-type” (salvaje o no – mutada) activada puede mejorar la expresión de Siah, Axina y GSK – 3b; activándose la degradación de β -catenina (62,183). Estos datos “in vitro” pueden explicar los hallazgos in vivo (donde la mutación de TP53 en los CCR provoca cúmulo de proteína p53 mutada, la cual también puede activar la degradación de β -catenina), apoyando la conclusión de que una combinación entre la negatividad de β -catenina y p53 incrementada contribuye a la formación de metástasis en el CCR. No obstante, se requieren más estudios para esclarecer los mecanismos moleculares de regulación de estos dos genes, sus interacciones y su papel en la progresión del CCR (155).

Pacientes con Poliposis adenomatosa familiar, portadores de mutaciones en la línea germinal APC, mostraron un incremento de niveles de β -catenina nuclear y

citoplasmática en el epitelio colorrectal, confirmando que dicho cúmulo aberrante es uno de los primeros eventos en la carcinogénesis colo-rectal (184).

Valentini et al (185) demostraron que en el epitelio displásico colorrectal se observa una correlación significativa entre los patrones de sobreexpresión de p53 y β -catenina; sólo un 32% del total de casos que mostraron un patrón de β -catenina citoplasmático, de membrana y nuclear fueron positivos para p53, versus el 88% que mostraron un patrón citoplasmático y/o de membrana ($p < 0,05$). Por lo tanto, la acumulación citoplásmica de β -catenina parecía desencadenar la sobreexpresión de p53 en lugar de su translocación nuclear. De hecho observaron en la zona de transición adenoma - carcinoma un aumento de p53 + en ambos patrones de β -catenina.

Se sabe que la sobreexpresión de β -catenina citoplasmática, como consecuencia de una inactivación del gen APC, es un evento temprano y contribuye a la multiplicación de las células afectadas incluso antes de la completa inactivación de p53 (186).

Hay una buena correlación entre la sobreexpresión inmunohistoquímica de p53 y la mutación genética (176), que explica el grado bajo de expresión inmunohistoquímica de p53 en el epitelio displásico con respecto a los tejidos cancerosos (del 48% al 85%) (185).

Smith et al, establecieron que la combinación mutacional en los CCR más frecuente era p53 y APC (187). A su vez, Valentini et al (185) estipularon que la correlación entre la β -catenina citoplasmática sobreexpresada y la p53 en tejidos displásicos podría ser debido a diferentes vías moleculares subyacentes (entre ellas, la alteración de APC). Sus resultados también demostraron que la expresión de β -catenina nuclear está presente en el frente invasivo y está directamente involucrado en el patrón de invasión. Además, las funciones de los patrones de β -catenina pueden ser diferentes: así, el patrón citoplasmático y/o de membrana probablemente pueda conducir a las alteraciones de p53; mientras que el patrón de membrana, citoplasmático y nuclear se relacione con la invasión celular (185).

Los mecanismos genéticos por los que surge un fenotipo mucinoso no están del todo aclarados, aunque se sugiere que son diferentes al de los CCR no mucinosos (188).

Ikedo et al, llevaron a cabo un estudio inmunohistoquímico y mutacional de β -catenina y p-53 en los dos tipos de CCR mucinoso definidos por ellos ("fix" y "flo"). Compararon el pronóstico de CCR mucinoso y no mucinoso, así como los pronósticos entre los dos subtipos de CCR mucinoso y analizaron las frecuencias de alteraciones en la vía de señalización Wnt (β -catenina) y la acumulación nuclear de p53 y K-ras por inmunohistoquímica (29). Demostraron que la tasa de supervivencia a 5 años de los

pacientes con CCR mucinoso en estadios II y III fue peor (43,1% y 79,4%, respectivamente, $P < 0,0001$) (29). Sugiriendo así que estas tasas de supervivencia se relacionan con una naturaleza más agresiva del tipo histológico mucinoso (29), a pesar de que en el resto de la literatura se sugiere que el pronóstico de los CCR mucinoso solo se relaciona con el estadio de la enfermedad y la extensión de la misma (189).

Ikeda et al (29) observaron una acumulación de β -catenina nuclear en el 100% y 94,7% de los casos de FIX y FLO, respectivamente (mostrando una frecuencia similar a la del NMC colo-rectal). Este resultado indicaría la posibilidad de que tanto los CCR mucinosos (los dos subtipos histológicos) como los no mucinosos, surgen a través de la misma disfunción de la vía de señalización de Wnt. Además, observaron una acumulación menor de p53 nuclear en el subtipo FLO.

Las frecuencias de anomalías en la vía de señalización, K-ras y p53 en el tipo FIX son similares a los de CCR no mucinosos, lo que sugiere que se desarrollan a través de mecanismos similares. Por otra parte, la frecuencia de alteraciones en p53 en el tipo FLO fue menor que en los CCR no mucinosos, a pesar de tener un peor pronóstico, lo que sugeriría que se desarrolla a través una vía diferente (29).

- Relación entre β -catenina y la inestabilidad de microsatélites

Los genes de reparación de errores génicos humanos (“human mismatch repair: MMR”) codifican una serie de proteínas (MSH2, MLH1, MSH3, MSH6, PMS1 y PMS2) que reconocen los errores (mutaciones) en el ADN resultantes de la replicación génica. Los lugares más frecuentes donde se producen estos errores espontáneos de replicación son las secuencias repetitivas simples, también llamadas microsatélites. Cada elemento de la región repetitiva tiene una longitud de uno a seis nucleótidos y son más comunes dentro de ADN no codificante. En las células con un sistema de reparación de ADN competente, se corrige la cadena de ADN mutado con la secuencia de ADN de tipo salvaje. Si la reparación de ADN es deficiente, debido a la ineficacia de proteínas MMR, se produce una inestabilidad de microsatélites (IMS), en las cuales la longitud de esas secuencias repetitivas (normalmente estable) varía considerablemente (190, 191, 192). La clasificación del estatus de IMS se basa en la alteración del tamaño de varios mononucleótidos y secuencias repetitivas de dinucleótidos. De tal forma que la inestabilidad de microsatélites alta (IMS-A) se define como la alteración de dos de los marcadores de microsatélites. Y la inestabilidad de microsatélites baja (IMS-B) se define como la alteración de uno de los marcadores (3).

El perfil de proteínas reparadoras (MMR) ha demostrado cierta correlación con el patrón de infiltración histológica en varias neoplasias (p.e. el carcinoma urotelial de

vejiga músculo-infiltrante), así como en el CCR (193). De tal forma que la falta de expresión de las proteínas MMR (estudiado por métodos inmunohistoquímicos) y el correspondiente perfil génico molecular se ha asociado a un recambio celular elevado (194,195). En concreto, en el compartimento profundo tumoral se han observado escasos mecanismos de regulación de la proliferación celular y apoptosis, lo que contribuiría a la acumulación de alteraciones génicas. Este patrón, se ajusta al perfil génico de un compartimento superficial con gen NF1 defectuoso y un compartimento profundo con gen TP53 defectuoso. Este perfil heterogéneo de IMS podría representar un estadio molecular temprano, y evolucionar a un perfil más homogéneo por acumulación de alteraciones génicas (196).

La inestabilidad de microsatélites (IMS) se ha observado en el 90% de los CCR hereditarios no – polipósicos y alrededor del 15% de los CCR esporádicos, asociándose con alteraciones de los genes de reparación, tales como MLH-1 y MSH-2, lo que resulta en un aumento de la inestabilidad de microsatélites (3,197).

Las neoplasias de tipo CCR caracterizadas por tener IMS, muestran una progresión tumoral rápida de adenoma a carcinoma y se asocian a un mejor pronóstico y mejor respuesta a quimioterapia (198).

En CCR esporádicos, la IMS-A suele deberse a la metilación del gen promotor de MLH-1, lo que se traduce en la pérdida epigenética de la expresión proteica de MLH-1 y su compañero de unión PMS2. Se puede hacer un diagnóstico indirecto de IMS-A usando marcadores inmunohistoquímicos para pérdida de proteínas reparadoras, con mayor precisión en los CCR esporádicos que en los heredados (3, 185, 199).

La inestabilidad de microsatélites (IMS) es un factor pronóstico y un marcador de reparación de genes deficientes (MMR) en los CCR. Debido a la heterogeneidad tumoral topográfica también presente en el CCR, al menos se deben obtener dos muestras de cada CCR para el estudio de proteínas MMR, preferiblemente del compartimento superficial (por encima de la muscular propia) y profundo (células tumorales infiltrando la capa muscular propia) (193, 200, 201).

La vía Wnt / β -catenina se ha asociado con un estado específico de inestabilidad de microsatélites en más del 90% de los CCR esporádicos (202, 203, 204, 205, 206). La estabilidad de microsatélites o la baja inestabilidad de microsatélites (EMS/IMS-B) juegan un pronóstico más desfavorable que los CCR con inestabilidad alta de microsatélites (IMS-A), debido a una acumulación aberrante de β -catenina nuclear, que se cree que es responsable del pronóstico desfavorable de los pacientes. El mecanismo

molecular que subyace bajo este comportamiento clínico diferente aún no ha sido completamente clarificado (202,203).

Pancione et al, demostraron en su serie que existía una asociación entre un patrón de expresión determinado de MLH-1 y MSH-2 con expresión de β -catenina nuclear y peor pronóstico, sobre todo en tumores sin afectación ganglionar (155). Además, los tumores que eran negativos para MLH-1, fueron significativamente negativos para β -catenina (mientras que no encontró semejante relación con MSH-2). Esta deficiencia de MLH-1 fue más frecuente en el colon proximal y se asociaba a estadios de Duke C-D y a peor pronóstico, por lo que se ha sugerido que una desregulación específica de MLH-1 pudiera ser responsable de la progresión en el CCR, independientemente de la activación de la vía Wnt canónica u otras vías de señalización que afecten a la expresión de β -catenina (155,20).

No obstante, Valentini et al (182), evaluó la acumulación anormal de β -catenina nuclear y su relación con los MMR, demostrando un patrón similar entre tumores con IMS y con EMS. Pero, al estar en desacuerdo con otros estudios (207), afirmaron que se necesitaba aclarar los hallazgos con un número mayor de casos.

Y a su vez, demostraron una relación estadísticamente significativa ($p<0.005$) entre la sobre-expresión de p53 y la estabilidad de microsatélites (EMS), lo cual apoyaría la hipótesis de dos vías diferentes de carcinogénesis para EMS y IMS (182).

Varios autores como Martensson et al (115) y Soussi et al (208), demostraron una relación significativa entre los tumores con EMS, la ausencia/débil expresión de β -catenina nuclear y la expresión normal de p53.

4. UTILIDAD DE MATRICES DE TEJIDO (MT) PARA LA VALORACIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS EN EL CCR

Con los recientes avances en el conocimiento de la genética molecular humana, nuevos mecanismos de enfermedad *basados en genes y su expresión proteica* están surgiendo en muchas áreas de la medicina. El estudio de nuevos marcadores de pronóstico y diagnóstico, en un gran número de muestras clínicas, es un paso importante para la traducción de los nuevos descubrimientos de la ciencia básica a la práctica clínica. La tecnología de matrices de tejidos (TMA) permite, estudiar en paralelo perfiles moleculares de ADN, ARN, y proteínas en numerosas muestras clínicas. Esta técnica proporciona a los patólogos la posibilidad de realizar estudios de muestras a gran escala, utilizando técnicas de inmunohistoquímica, hibridación in situ fluorescente, o hibridación in situ de ARN; sustancialmente más rápido y con un coste notablemente más bajo en comparación con el enfoque convencional (209).

Las nuevas tinciones inmunohistoquímicas para las proteínas asociadas a tumores es una herramienta útil para la identificación de los nuevos marcadores pronósticos. Para poder estudiarlas, los TMA son una técnica de alto rendimiento que permite la conservación de tejidos. Esta técnica utiliza muestras biópsicas cilíndricas (“core”) de 0,6 mm obtenidas del tejido tumoral completo de cientos de especímenes que se colocan en un nuevo bloque único de parafina llamado matriz, que puede cortarse hasta 100 veces (210). Dado que las muestras tumorales para el diagnóstico a menudo son pequeñas, la utilización de pequeños cilindros tisulares contribuye a la preservación del tejido. Además, las áreas tumorales de las que se va a obtener el “core” deben ser cuidadosamente seleccionadas y sometidas a estudios de validación para reducir el número de secciones que contienen tejido no representativo y, por lo tanto no evaluables. Por lo tanto, la técnica de matrices de tejidos para estudios inmunohistoquímicos permite, a un tiempo, la realización de estudios de múltiples marcadores biológicos en grandes series de casos y la conservación de los tejidos.

A pesar de que los TMA son un método útil para el examen de biomarcadores y otras alteraciones moleculares en muestras de tejido, la validez de este método puede variar para diferentes biomarcadores en diferentes muestras de tejido (211).

Los sistemas de puntuación para marcadores tumorales en el CCR se basan en algún tipo de medición de la cantidad de células tumorales positivas y, algunas veces, se combinan con un grado de intensidad de la tinción (212-214). Sin embargo, Atkins et al. (215) demostraron, al usar un anticuerpo anti-EGFR (en cáncer de cabeza y cuello, carcinomas pulmonares de células no pequeñas, y en adenocarcinoma colorrectal) que el grado de intensidad de la tinción varía según el tipo de tumor. Esto fue influenciado parcialmente por la elección de los fijadores, y se correlacionó inversamente con el tiempo de almacenamiento de las secciones de tejido sin teñir. Estos factores, además de la variación en los protocolos de IHC, contribuyen inevitablemente a la naturaleza subjetiva de la intensidad de la tinción. Por lo que los resultados contradictorios de diferentes informes sobre los mismos marcadores tumorales pueden explicarse, en parte, por esta evaluación subjetiva de la inmunoreactividad (216,217).

A pesar de la tinción heterogénea de los marcadores inmunohistoquímicos de p53, Ki-67, MSH1, MLH2, PMS6, y β -catenina existe amplia bibliografía que respalda su utilidad y uso en matrices tisulares (210, 211, 218, 219). Además, la evaluación de la inmunorreactividad mediante un método de valoración semi-cuantitativo parece ser suficiente para establecer asociaciones entre los marcadores tumorales seleccionados y la mayoría de las características clínico-patológicas (212).

El estudio de Su et al (211), indica que los TMA se pueden usar para una evaluación fiable de los niveles de expresión de Ki-67, Ciclina D1, β -catenina, la

ciclooxigenasa-2, y el factor de crecimiento epidérmico receptor en tejidos adenoma colo-rectal (con un índice de concordancia entre los datos del TMA y las secciones completas que varían entre el 87 y el 93%).

Fernebro et al (210), llegaron a la conclusión de que con el método de matrices de tejido se obtiene una tinción inmunohistoquímica de buena calidad para estudios en el cáncer rectal, ofreciendo datos de expresión de Ki-67 y p53 comparables (en rendimiento y calidad) a los obtenidos en el tejido tumoral completo.

Jourdan et al (189), validaron la tecnología de matrices de tejidos en carcinoma colorrectal mediante el análisis de la expresión inmunohistoquímica de las proteínas implicadas en las dos vías principales de la carcinogénesis colorrectal: la proteína p53 y las proteínas de inestabilidad de microsatélites (MSH2 y MLH1). Se comparó en 30 carcinomas colo-rectales (15 IMS (-) y 15 IMS (+)), cilindros de tejido y la sección completa del bloque de la que se derivaron. El tejido tumoral estuvo presente en el 95,7% de los cilindros incluidos en la matriz. El análisis de los tres “cores” por caso fue comparable al análisis de la sección completa tumoral en 99,6% (p53), 98,8% (MLH1), y 99,2% (MSH2) de los casos.

Zlobec et al (212), evaluaron el porcentaje de positividad nuclear de p53, APC citoplásmico y de β -catenina nuclear, trabajaron con una sola muestra (“core”) por tumor y hallaron una alta reproducibilidad inter-patólogo. Aunque se argumenta que un solo “core” de tejido puede no ser representativo de todo el tumor, sus resultados se aproximan a los de grandes secciones de tejido. Goethals et al. (220), estipularon que cuatro “cores” son suficientes para contrarrestar la heterogeneidad tumoral, pero esto no es siempre posible, por lo que Zlobec et al (212) compensaron la heterogeneidad tumoral con una serie amplia de muestras, además afirma que la evaluación de un solo “core” por tumor puede conducir a un análisis de la positividad (en porcentaje) y la gradación de intensidad más fiable entre observadores, precisamente porque evalúan la misma área del tumor (212).

II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

El cáncer colo-rectal (CCR) es la tercera neoplasia más prevalente, a nivel mundial (después del de pulmón y el de mama) y la segunda causa de muerte por cáncer. Se considera que la posibilidad de que un individuo, con riesgo promedio, padezca cáncer colo-rectal durante su vida es del 6%. En la Unión Europea, la incidencia y mortalidad del CCR es de 58/100.000 y 30/100.000 por año, respectivamente. En España, los últimos datos publicados muestran que se diagnosticaron casi 30.000 nuevos casos de CCR y casi 15.000 fallecieron por esta enfermedad; en particular, en Andalucía se ha constatado también un aumento de la incidencia y mortalidad.

Por el impacto médico y social que supone el CCR, es necesario incorporar -de manera urgente- medidas para mejorar la situación actual. Además, teniendo en cuenta, tanto el proceso acelerado de envejecimiento de la población, como las estimaciones realizadas respecto al aumento de las tasas de incidencia y mortalidad, es muy importante -amén de las imprescindibles acciones de diagnóstico precoz- poder determinar los factores que influyen en su pronóstico, especialmente en los pacientes que han sido operados con intención curativa.

Dado que el CCR no parece obedecer a una única mutación o alteración génica, sino que pueden coexistir varias de ellas en el mismo paciente, resulta lógico suponer que el pronóstico y la evolución del paciente pueden variar dependiendo de las mutaciones o alteraciones que se detecten. Las últimas dos décadas han sido testigo de un importante avance en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares responsables del desarrollo y diseminación del cáncer colo-rectal. Sin embargo, estos avances básicos no se han traducido en aplicaciones clínicas significativas, y la mayoría de nuestras decisiones terapéuticas siguen basadas en las clasificaciones más descriptivas, fundamentadas en la morfología e histopatología del tumor.

Desde que Vogelstein, a finales de 1980, propusiera el modelo de carcinogénesis colónica, hasta la clasificación molecular actual del cáncer colo-rectal, se han incorporado nuevos conocimientos y datos que establecen dos mecanismos alternativos de inestabilidad genómica en la carcinogénesis colo-rectal: la inestabilidad cromosómica y la inestabilidad de microsatélites, que ocurre en un 10-15% de los CCRs esporádicos. Además, existe un elevado número de alteraciones genéticas puntuales, muchas de las cuales se sitúan en la vía de Wnt y afectan a su principal efector: la β -catenina.

El estudio de nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico en un gran número de muestras clínicas es un paso importante en la traslación de los nuevos descubrimientos de la ciencia básica a la práctica clínica. La tecnología de matrices de tejidos (TMA) posibilita el examen, de manera simultánea, de perfiles moleculares de ADN, ARN y proteínas en numerosas muestras. Este método permite a los patólogos realizar estudios a gran escala (utilizando técnicas inmunohistoquímicas; de hibridación in situ fluorescente o de hibridación in situ de ARN), lo cual es sustancialmente más rápido y tiene un coste notablemente más bajo que el método de estudio convencional.

Además de estas consideraciones técnico-metodológicas, tenemos que tener siempre presente los aspectos relativos a la heterogeneidad de los tumores de colon y recto. Estas son fundamentalmente de tipo morfológico: que se sustentan en las diferencias topográficas existentes en cuanto al tipo histológico y al grado del tumor, así como en otras de carácter biológico (por ejemplo, las variaciones cinéticas propias del componente superficial versus zona profunda del tumor).

En base a todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo se propone, en una serie de 170 casos de CCR, establecer la participación de la vía molecular Wnt, mediante la valoración del patrón de inmunoexpresión de su efector principal, la β -catenina, y la interacción con otros mecanismos moleculares relacionados con la carcinogénesis mediados por p53, el índice de proliferación celular Ki-67 y la estabilidad de procesos de reparación de posibles alteraciones del ADN.

A su vez, se pretende, con todos los marcadores inmunohistoquímicos usados en este estudio (β -catenina, p53, Ki-67 y proteínas reparadoras MLH1, MSH2 y PMS2), establecer -si existe- un patrón de tinción diferencial entre componente superficial y profundo del mismo tumor.

En definitiva, se persigue establecer

1º) La interacción entre β -catenina y p53, así como la presencia o ausencia de expresión de proteínas reparadoras de errores en la transcripción de ADN en zona superficial y profunda del tumor.

2º) El impacto de estos marcadores inmunohistoquímicos en el diagnóstico histopatológico (en relación con la localización, tamaño tumoral, grado, tipo y extensión loco-regional) y con el pronóstico/evolución de los pacientes (relación con TNM, estadio, presencia y localización de metástasis y supervivencia).

III. MATERIAL Y MÉTODO

A. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para realización de este estudio se han seleccionado 170 casos de pacientes diagnosticados de cáncer de colon y recto, desde el 1 de enero de 1994 hasta el 31 de diciembre de 1998, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga.

- Criterios de inclusión

1. Casos con diagnóstico de cáncer colo-rectal entre el 1 de enero de 1994 y 31 de diciembre de 1998, para que el seguimiento mínimo fuese de 15 años.
2. Casos con las muestras histológicas disponibles (cortes originales de hematoxilina – eosina, así como bloques de parafina) que fuesen representativas y en los que se pudiesen diferenciar: componente del tumor superficial, zona profunda y mucosa sana adyacente al tumor.

Estos criterios han hecho que, al final de la selección, se hayan reducido el número de casos estudiados.

Uno de los problemas surgidos durante el trabajo ha sido la representatividad de tejido/caso en algunas de las matrices de tejido. En estos, se ha recurrido al corte histológico completo, para lo cual se ha realizado una selección de los bloques de parafina basada en una evaluación de un nuevo corte y tinción con hematoxilina – eosina, a fin de confirmar la representatividad residual tumoral (tras la extracción previa de cilindros).

En base a lo cual, de los 170 casos originales que cumplían los criterios de inclusión;

- hay 6 de ellos cuya historia clínica está incompleta y,
- hay 16 casos en los que no se ha dispuesto de suficiente material representativo en los cortes de TM para marcadores inmunohistoquímicos.

Estos pacientes han sido incluidos en el estudio a sabiendas de que no se disponía de la información completa relativa a todos los marcadores. De tal forma que solo se ha podido realizar una evaluación parcial de los mismos.

B. MÉTODOS

1. REALIZACIÓN DE MATRICES DE TEJIDO (MT)

Previo a la búsqueda de los bloques de parafina se ha realizado un análisis de los informes anátomo-patológicos. Posteriormente, se hizo una revisión de las preparaciones histológicas correspondientes para seleccionar el bloque y el área más representativa, de las zonas superficial y profunda del tumor (así como de la mucosa adyacente de aspecto normal), para obtener la muestra destinada a la matriz de tejidos (MT).

Todas las preparaciones y los bloques de parafina seleccionados para confeccionar las MT de los tejidos neoplásicos correspondientes fueron remitidos a la Unidad de Apoyo a la Investigación Oncopatológica UMA de Málaga.

- Validación del estudio en MT

Como ya ha sido descrito por otros investigadores, 25 casos elegidos al azar servirán para llevar a cabo la validación de representatividad de los anticuerpos, que consistió en un estudio comparativo entre la reactividad inmunohistoquímica encontrada en el corte tisular completo y la observada en la muestra seleccionada para TMA. Por cada caso se extrajeron 3 cilindros, construyéndose en total 3 TMA de 25 muestras cada uno, con representación de cada uno de los casos.

- Construcción del MT

Para la realización de los MT se ha utilizado un *arrayer* de tejidos (Beecher Instruments) de tipo manual, construyéndose bloques de parafina con 80 cilindros de tejido tumoral. El diámetro del cilindro fue de 1mm, basándonos en estudios previos realizados por el grupo de investigación. Cada caso está representado 4 veces, en bloques y localizaciones diferentes (dos cilindros de la región superficial de la lesión y dos de la infiltrante/profunda). Los casos se han distribuido en bloques de MT diferentes siguiendo los siguientes criterios: año de diagnóstico y afectación (local, regional y a distancia), para facilitar la lectura de las matrices y posterior estudio estadístico. También se ha realizado un TM con 40 muestras de colon normal de zona de transición, no asociado a patología neoplásica (al menos 1 cm distante de la masa tumoral), a efectos comparativos con la reactividad en tejido neoplásico.

2. MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

- Protocolo de inmunotinción

Previo a la tinción inmunohistoquímica de los cortes de MT, se procedió a determinar el método de desenmascaramiento antigénico más apropiado, en cortes de tejido control de conocida positividad. En los bloques de MT se realizaron cortes consecutivos de parafina de 4-5 micras de grosor, en portas tratados (ChemMate, DAKO, Copenhagen, Dinamarca). Antes de la inmunotinción los cortes de tejido fueron sometidos a un proceso de desenmascaramiento antigénico. La técnica inmunohistoquímica se ha llevado a cabo en los equipos de inmunotinción automatizada DAKO TechMate Horizon y Autostainer, usando como método de visualización de la reacción antígeno-anticuerpo el sistema EnVision (DAKO). De forma resumida: se realizó bloqueo de la peroxidasa endógena (DAKO Peroxidase Block), incubación con anticuerpo primario, incubación con el polímero marcado y luego con el sustrato cromógeno (DAB), contratinción con hematoxilina y montaje. Como control de calidad, cada grupo de inmunotinciones se ha realizado con un determinado anticuerpo, incluyendo un correspondiente control positivo y un control negativo, donde el anticuerpo primario fue sustituido por suero no inmune de la misma especie que el anticuerpo primario.

- Anticuerpos utilizados

Se han seleccionado marcadores relacionados con:

- la proliferación celular y su control, como Ki67 (clona SP6, Master Diagnóstica, España) y p53 (clona SP5, Master Diagnóstica, España);
- la vía wnt: la beta-catenina (policlonal, Master Diagnóstica, España).
- el sistema de reparación de errores de la replicación (MMR) controlado fundamentalmente por las proteínas MLH1 (clona G168-728, Master Diagnóstica, España), MSH2 (clona G219-1129, Master Diagnóstica, España), PMS2 (clona MRQ-28, Master Diagnóstica, España).

Todos los anticuerpos son monoclonales, se han obtenido de sobrenadante de cultivo purificado, pre-diluido en un polímero sintético orgánico lineal en solución tamponada (pH 7.4) que contiene un agente bacteriostático y bactericida, listos para su uso.

Los patrones de tinción habitual son:

- Ki-67, p53, MLH1, MSH2 y PMS2: nuclear.
- B-catenina: membrana, citoplasma y nuclear.

3. VALORACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN

Los datos de tinción inmunohistoquímica se han obtenido tras la observación y cuantificación al microscopio óptico de los cortes de matrices de tejido inmunoteñidos. Se realizó la evaluación de las matrices de forma manual y a doble ciego (dos facultativos patólogos independientes).

Con cada marcador inmunohistoquímico realizado, independientemente del control externo, se valoró un control positivo interno a la propia muestra (las células epiteliales normales, linfocitos y/o células estromales, dependiendo del marcador).

4. CONVENIENCIA DEL MÉTODO

La metodología de MT ha permitido un análisis más simplificado debido al estudio simultáneo de un gran número de muestras, y, por otro lado, supone un gran ahorro en reactivos sobre el uso de cortes titulares completos. Los resultados estadísticos son más fiables, dado el elevado número de casos que se pueden analizar con este método. El empleo del inmunoteñidores automáticos ha facilitado la estandarización de condiciones para todos los casos de la serie, evitando la variabilidad metodológica. El uso de EnVision (polímero marcado con enzima) como método de visualización de la reacción inmunohistoquímica ha evitado la tinción inespecífica de biotina endógena que aparece frecuentemente con el sistema avidina-biotina, facilitando así la visualización del anticuerpo, por ser altamente sensible y con notable amplificación de la señal.

C. VARIABLES ESTUDIADAS

1. VARIABLES CLÍNICO - PATOLÓGICAS

Los datos clínicopatológicos fueron aportados por la base de datos del RHT o en su defecto se extrajeron de las historias clínicas de los pacientes, siguiendo las directrices del manual de procedimientos de la RN-RHTs.

- **Edad del paciente en el momento del diagnóstico.** Fue recogida en años (variable de confusión numérica).

- **Sexo.** Se consideró como:

1. *Varón*

2. *Mujer*

(variable de confusión numérica)

- **Localización.** Se categorizó en:

1. *Colon ascendente y ángulo hepático*

2. *Colon transverso y ángulo esplénico*

3. *Colon descendente y sigmoide*

4. *Recto*

(variable de confusión numérica)

- **Seguimiento de los pacientes**

La recogida de datos de los pacientes se ha realizado a través del Registro Hospitalario de Tumores (RHT), encargado de la recopilación de unos datos mínimos del paciente y de actualizar el seguimiento anualmente.

El seguimiento de todos los casos incluidos en el estudio ha sido actualizado a 31 de diciembre de 2012. Los datos de seguimiento de los pacientes recogidos han permitido determinar la supervivencia global en meses. Para lo cual, también se recogieron datos como:

- ***La fecha de diagnóstico (día-mes-año)***
- ***Fecha de recidiva posterior (día-mes-año)***
- ***La fecha de última revisión (día-mes-año)***
- ***El estado del paciente en la última revisión (E.U.C.),*** que se tabuló según los siguientes criterios:

1. *Paciente vivo, sin enfermedad*

2. *Paciente vivo, con enfermedad*

3. *Paciente muerto, por enfermedad*

4. *Paciente muerto, por otras causas*

5. *Paciente perdido para seguimiento*

En el caso de los pacientes fallecidos, se recogió también la variable **fecha de fallecimiento (día-mes-año)**. Mientras que en los casos de los pacientes vivos (EUC de tipo 1, 2 o 5), se recogió la **fecha del último contacto (día-mes-año)**.

A partir de estas fechas y del estado del paciente, se calculó **la supervivencia global (en meses)**; la cual se describe como la diferencia entre la fecha de última de revisión/fallecimiento y la fecha de diagnóstico. La variable supervivencia es numérica de tipo continuo y será la variable dependiente del estudio.

2. VARIABLES HISTO-PATOLÓGICAS

- Tamaño tumoral

Se define como el diámetro tumoral mayor (de las tres medidas tridimensionales recogidas) descrito en el examen macroscópico de la pieza de resección colo-rectal (una variable de confusión recogida en centímetros).

- Tipo histológico

La clasificación, según la OMS (2010), de los tumores epiteliales malignos de colon y recto (excluyendo, por tanto, el canal anal) presenta las siguientes variedades: a. adenocarcinoma (convencional); b. adenocarcinoma mucinoso; c. carcinoma de células en anillo de sello; d. carcinoma adeno-escamoso; e. carcinoma medular; e. carcinoma neuroendocrino de alto grado; f. carcinoma indiferenciado; e. otros (especificar). En nuestro estudio, en base a la prevalencia de unos tipos y extremada rareza de otros, hemos reducido la clasificación a tan solo dos subgrupos (variable de confusión numérica), que son:

1. Usual/convencional

2. Mucinoso con/sin presencia de células en anillo de sello

- Grado

Basándonos en la evaluación del porcentaje tumoral compuesto por elementos glandulares, se estableció el grado como:

1. Bien diferenciado: las estructuras glandulares ocupan > 95% del tumor.

2. Moderadamente diferenciado: las estructuras glandulares ocupan 50 - 95% del tumor.

3. Pobrementemente diferenciado: las estructuras glandulares ocupan 5 - 50% del tumor.

4. Indiferenciado: las estructuras glandulares ocupan < 5% del tumor.

(variable de confusión numérica)

- Necrosis

Definida como la presencia de siluetas celulares tumorales (aspecto velado en la tinción convencional de H-E), con presencia de detritus celulares mezclados con celularidad inflamatoria (leucocitos, linfocitos y macrófagos), afectando tanto al componente glandular y, en menor proporción al componente estromal de la mucosa tumoral. Para definir la presencia de necrosis, esta debía suponer al menos el 50% del tamaño tumoral de la muestra. Se descartó la ulceración superficial tumoral (variable de confusión numérica):

1. Ausencia

2. Presencia

- Infiltrado inflamatorio crónico peritumoral

Se consideró de la siguiente manera:

1. Ausencia: Sin evidencia de leucocitos (particularmente eosinófilos), linfocitos, células plasmáticas, mastocitos e histiocitos peritumorales, en la zona de crecimiento o mínimo infiltrado disperso/en pequeños cúmulos.

2. Presencia: Definida como la presencia de un pronunciado infiltrado predominantemente linfo-plasmocitario (aunque también pueden existir leucocitos, mastocitos e histiocitos) en el margen de crecimiento o frecuentes cúmulos linfocitarios perivasculares.

(variable de confusión numérica)

- Frente de infiltración

Definido como:

1. Expansivo: Margen infiltrante bien definido o expansivo (rechazando en su crecimiento a las estructuras vecinas).

2. Digitiforme: Margen infiltrante que diseca y separa elementos contiguos de los tejidos que invade.

(variable de confusión numérica)

- **Fibrosis/desmoplasia**

Se define como la formación de tejido fibroso “nuevo”, compuesto por haces de colágeno y fibroblastos, que rodea las estructuras glandulares neoplásicas, presente sobre todo en el frente de infiltración. Se valoró la:

1. *Ausencia*

2. *Presencia*

(variable de confusión numérica)

- **Componente mucinoso**

Esta designación se aplicó si más del 50% de la lesión está compuesta por mucina. Fueron definidos 3 grados de componente mucinoso:

1. *Ausencia*

2. *Mucinoso de tipo “floating” con/sin células en anillo de sello*: lagos de mucina extracelular que contienen células neoplásicas en estructuras acinares, islotes o sueltas, con/sin presencia de células con una gran vacuola de mucina que ocupa todo el citoplasma y desplaza el núcleo (c. en anillo de sello).

3. *Mucinoso de tipo “fixed”*: lagos de mucina total/parcialmente tapizados por epitelio columnar alto (productor de mucina), a modo de grandes estructuras glandulares dilatadas.

(variable de confusión numérica)

- **Patrón cribiforme**

Glándulas grandes compuestas a su vez por glándulas pequeñas dispuestas “back to back”. Sin evidencia de fusión glandular. Es una variable de confusión numérica en:

1. *Ausencia*

2. *Presencia*

(variable de confusión numérica)

- **Invasión vascular**

Se ha definido como la presencia de estructuras glandulares neoplásicas atravesando la pared vascular o adherida a la capa endotelial, tanto de vasos sanguíneos como linfáticos localizados más allá de la pared muscular intestinal y se gradó como:

1. *No precisable*

2. *Ausencia*

3. *Presencia*

(variable de confusión numérica)

- **Invasión perineural**

Se ha definido como la presencia de permeación del perineuro de estructuras nerviosas por formaciones glandulares neoplásicas. Se valoró del siguiente modo:

1. *No precisable*

2. *Ausencia*

3. *Presencia*

(variable de confusión numérica)

- **Ganglios afectos**

Se ha definido como la presencia de ganglios linfáticos con estructuras glandulares neoplásicas de localización subcapsular o bien tejido glandular neoplásico ocupando y desestructurando parcial/completamente el parénquima ganglionar, con o sin presencia de rebasamiento capsular. Es una variable de confusión numérica que se recogerá en número de ganglios loco-regionales afectos.

- **Extensión loco-regional**

Se categorizó del siguiente modo:

1. *In situ*

2. *Local (se limita al órgano)*

3. *Regional (afecta a otras vísceras ó regiones vecinas)*

4. *Diseminado*

5. *Desconocida*

(variable de confusión numérica)

- **Estadio de extensión TNM**

Se valoró del siguiente modo:

- ***Ca. colorrectal con extensión local (pT):***

- Tumor que invade la submucosa (pT1)

- Tumor que invade la muscularis propia (pT2)

- Tumor que invade a través de la muscularis propia, afectando a los tejidos pericólorrectales (pT3)

- Tumor que invade directamente o está adherido a otros órganos/estructuras (pT4).

- ***Ca. colo-rectal con afectación de ganglios linfáticos regionales (pN):***
 - Sin posibilidad de especificar (pNx)
 - Sin evidencia de afectación de ganglios regionales (pN0)
 - Afectación en 1 ganglio linfático regional (pN1a)
 - Afectación en 2 - 3 ganglios linfáticos regionales (pN1b)
 - Implantes tumorales en la subserosa, o en tejidos pericólicos/peri-rectales no peritoneales, sin afectación ganglionar linfática regional (pN1c)
 - Afectación en 4 - 6 ganglios linfáticos regionales (pN2a)
 - Afectación en 7 o más ganglios linfáticos regionales (pN2b)

Cualquier nódulo tumoral en el tejido adiposo sin evidencia de tejido linfoide residual deberá ser considerado como un ganglio linfático regional metastásico siempre que tenga la forma y las irregularidades de contorno de un nódulo linfático.

- ***Ca. colo-rectal con metástasis a distancia. (pM):***

- Sin evidencia de metástasis (pN0)
- Presencia de metástasis a distancia (pM1)

- **Estadios según la clasificación TNM**

Es una variable de confusión numérica categorizada tal y como sigue:

1. ***Estadio I.*** Contempla los siguientes estadios de extensión TNM:
T1N0M0; T2N0M0.
2. ***Estadios IIA, IIB y IIC.*** Contempla los siguientes estadios de extensión TNM:
T3N0M0; T4N0M0.
3. ***Estadios IIIA, IIIB, y IIIC.*** Contempla los siguientes estadios de extensión TNM:
T1-T2N1M0; T1N2aM0; T3-T4N1M0; T2-T3N2aM0; T1-T2N2bM0;
T4N2aM0; T3-T4N2bM0.
Es decir; cualquier tipo de T combinado con N1 o N2, y sin evidencia de metástasis (M0).
4. ***Estadios IV.*** Cualquier tipo de T y N, combinado con M1.
(variable de confusión numérica)

- **Recidiva posterior**

Se categorizó tal y como sigue:

Metástasis en órganos:

1. *Ninguna*
2. *Hígado*
3. *Hígado y pulmón y/u otras localizaciones (tal u como duodeno, hueso, piel, etc.).*
4. *Pulmón*

Metástasis en ganglios distales:

5. *Ganglios de la raíz mesentérica*
6. *Carcinomatosis peritoneal/epiplóica*

Recidiva local (a nivel presacro, etc.):

7. *Recidiva local*
8. *Recidiva local + metástasis*
(variable de confusión numérica)

3. VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

Cada marcador inmunohistoquímico, según los requerimientos de patrón de tinción, ha sido evaluado e interpretado como sigue:

- **P53 y Ki-67 (evaluación cuantitativa)**

Contabilizando el número de células con núcleos positivos en 3 campos de gran aumento (40x) por cada cilindro de la matriz y realizando la correspondiente media aritmética entre los tres campos y, posteriormente entre los tres resultados de áreas (cilindros) de cada zona (superficial y profunda tumoral, y mucosa sana).

De la interpretación se deriva es una variable numérica continua que se ha recogido como porcentaje (%) de núcleos positivos.

- **PMS2, MLH-1 y MSH-2 (evaluación cualitativa)**

La evaluación ha sido cualitativa. Evaluando la presencia o ausencia de células con núcleo positivo en 3 campos de gran aumento (40x) por cada cilindro de la matriz.

- 1: Negativo = Cuando se evidencia un 0% de tinción nuclear. Es decir, vías de reparación alteradas.

2: Positivo = Cuando se evidencie = o> de 3-5 núcleos células con tinción nuclear.
Es decir, vías de reparación no alteradas.
(variable numérica categórica).

- **β -Catenina**

Se ha realizado una evaluación una semicuantitativa, en base a dos parámetros; la intensidad y la distribución. A su vez, es distinta en muestra de mucosa tumoral de la mucosa normal de transición. Se contabilizan 100 células /campo de gran aumento (40x) y, a su vez, se evalúan tres c.g.a. por cada cilindro de la matriz.

Se interpretó y categorizó tal y como sigue:

Mucosa tumoral:

- 0: tinción de membrana basolateral débil y discontinua (intensidad igual o menor que el epitelio normal) o nula (fig. 1).
- 1: tinción de membrana y/o citoplasmática aumentada (fig. 2),
- 2: tinción nuclear débil o focal (figura 3),
- 3: tinción nuclear intensa o difusa,
- 4: combinación de 1 + 2 figura 4),
- 5: combinación de 1 + 3 figura 5),

Mucosa sana de transición:

- 0: Tinción débil, escasa o ausencia de tinción (en la mayoría de la muestra celular), (figura 6),
 - 1: tinción de membrana basolateral focal (figura 7),
 - 2: tinción de citoplasma y membrana continua o intensa (figura 8).
- (variable numérica categórica).

Figura 1. Corte histológico correspondiente a CCR, con tinción inmunohistoquímica β -catenina en membrana y/o citoplasma disminuida (objetivo 40x).

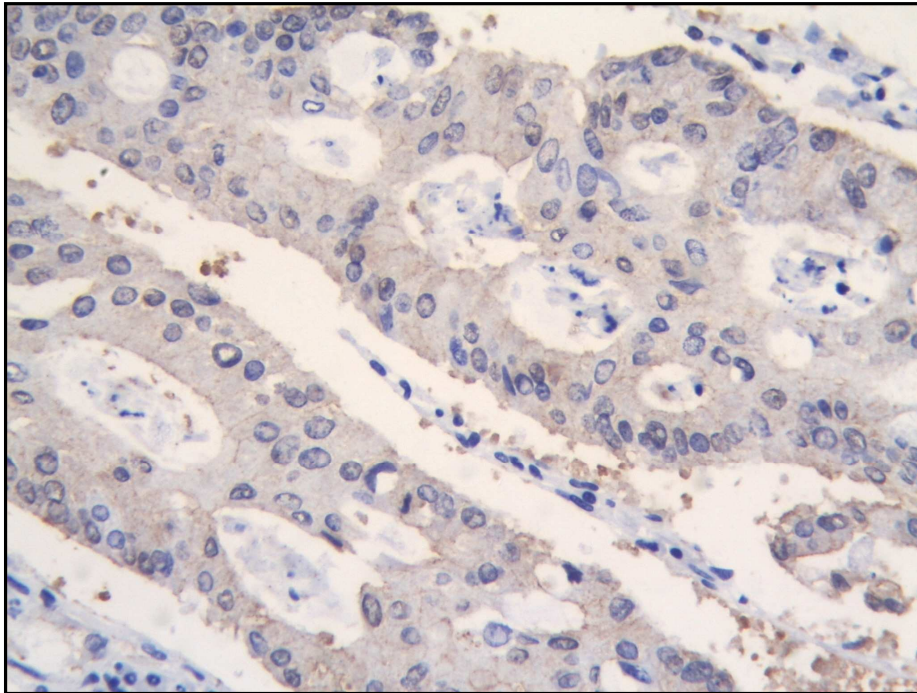


Figura 2. Corte histológico correspondiente a CCR, con tinción inmunohistoquímica β -catenina en membrana y/o citoplasma aumentada (objetivo 40x).

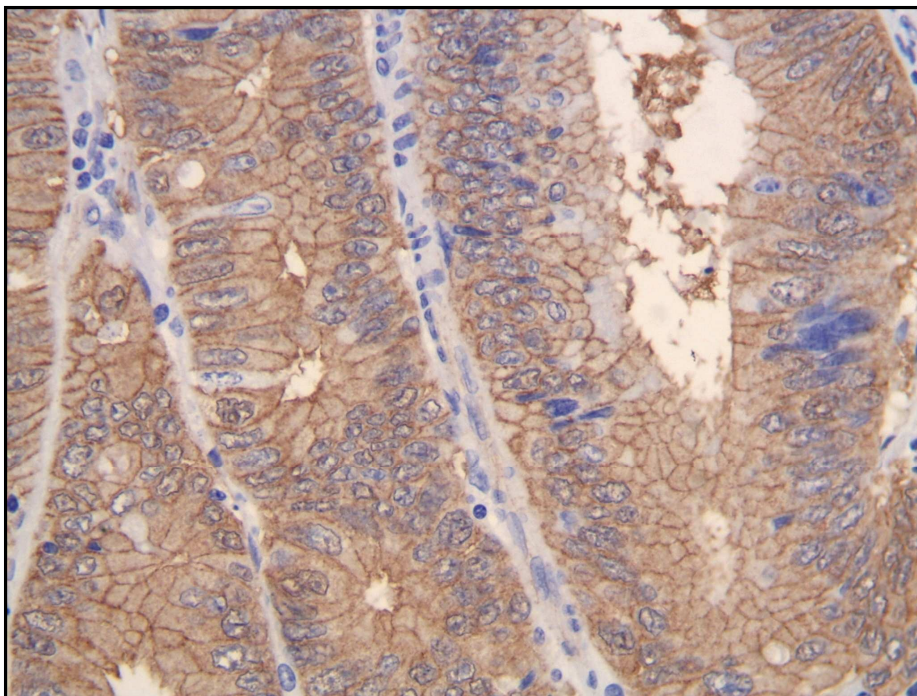


Figura 3. Corte histológico correspondiente a CCR, con tinción inmunohistoquímica β -catenina nuclear débil o focal (objetivo 40x).

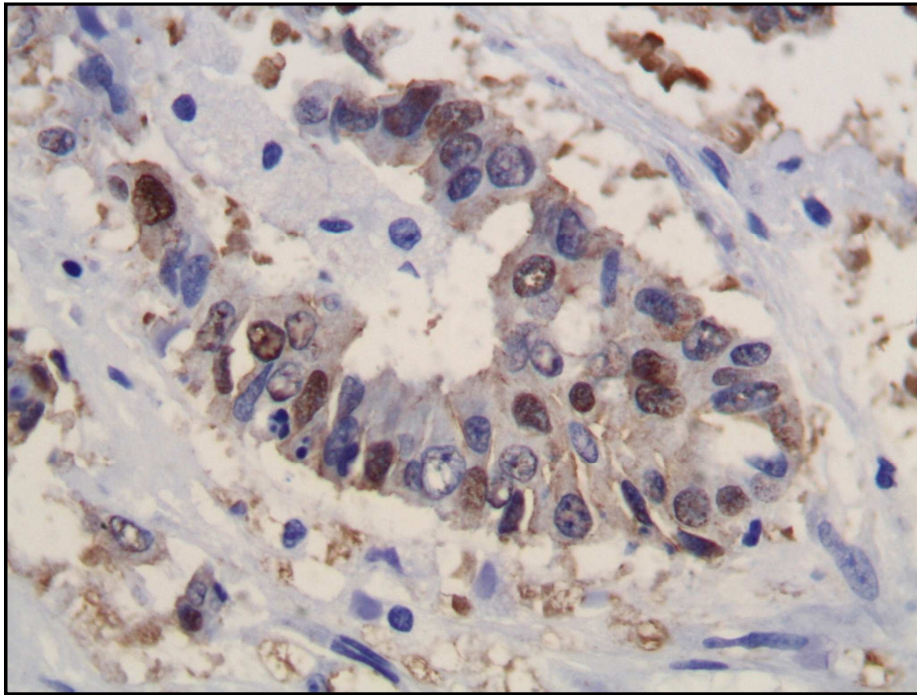


Figura 4. Corte histológico correspondiente a CCR, con tinción inmunohistoquímica β -catenina en membrana y/o citoplasma amentada, y nuclear débil o focal (objetivo 63x).

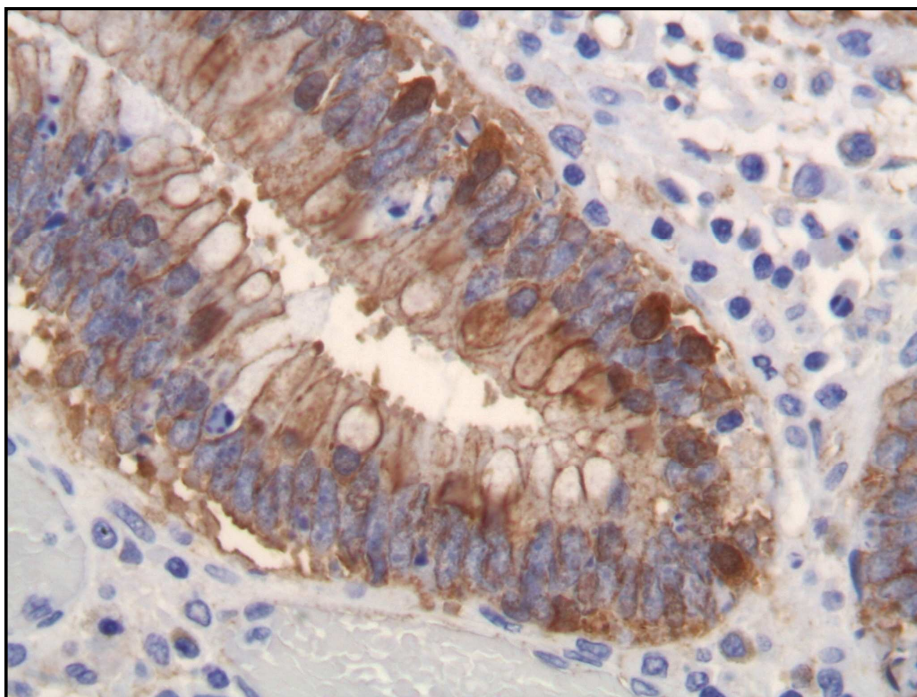


Figura 5. Corte histológico correspondiente a CCR, con tinción inmunohistoquímica β -catenina en membrana y/o citoplasma aumentada, y nuclear intensa o difusa (objetivo 63x).

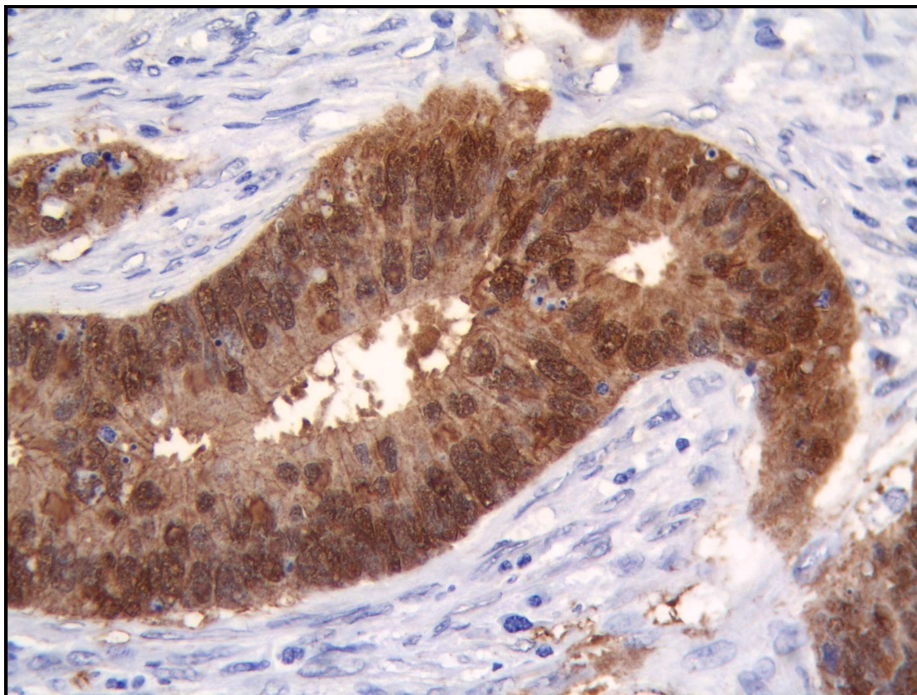


Figura 6. Corte histológico correspondiente a mucosa colónica sana, con tinción inmunohistoquímica β -catenina en membrana basolateral débil, escasa o ausencia de tinción (objetivo 63x).

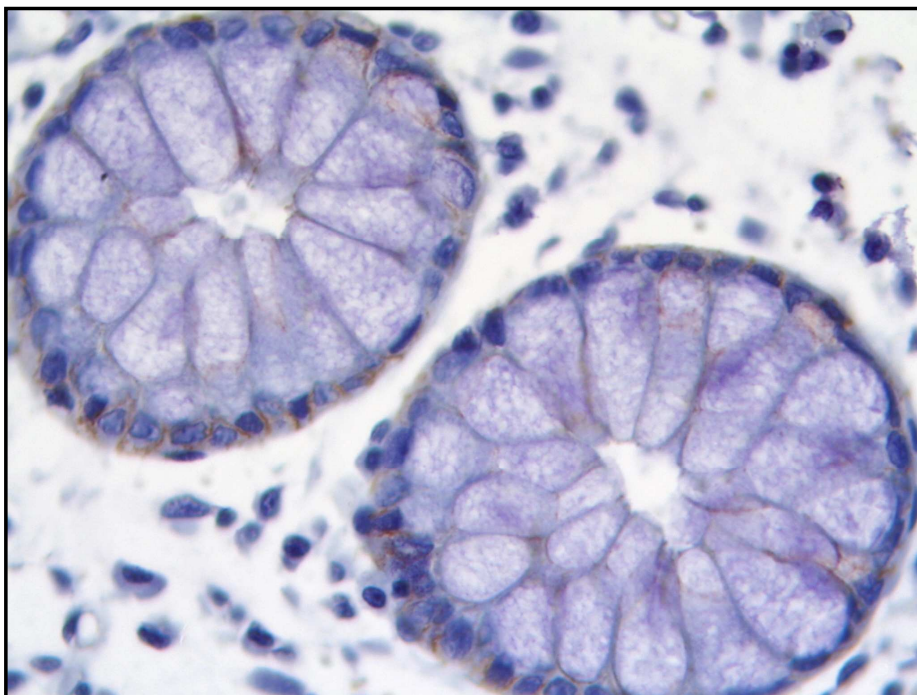


Figura 7. Corte histológico correspondiente a mucosa colónica sana, con tinción inmunohistoquímica β -catenina en membrana basolateral focal (objetivo 63x).

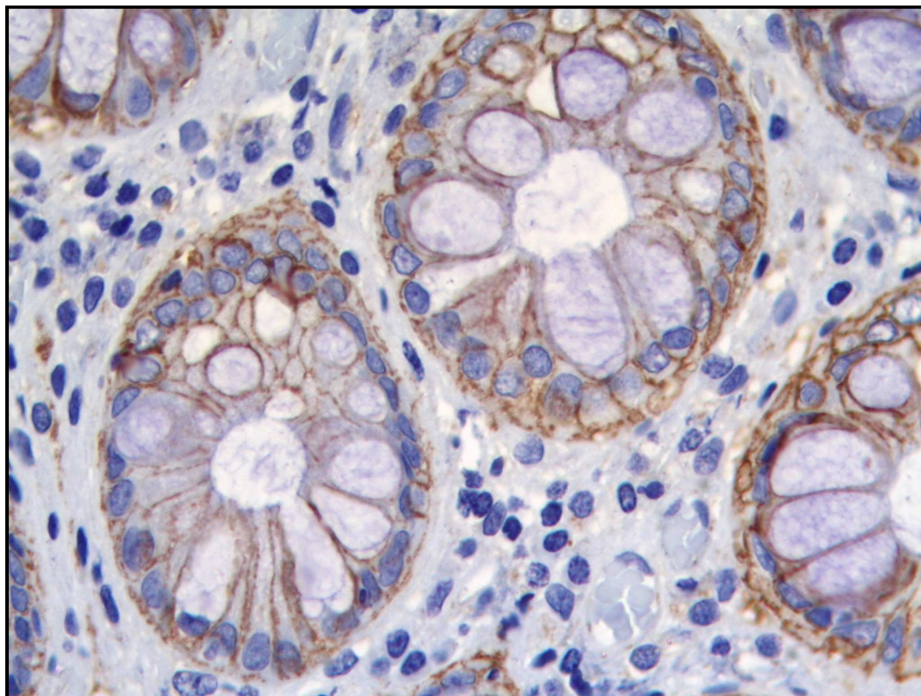
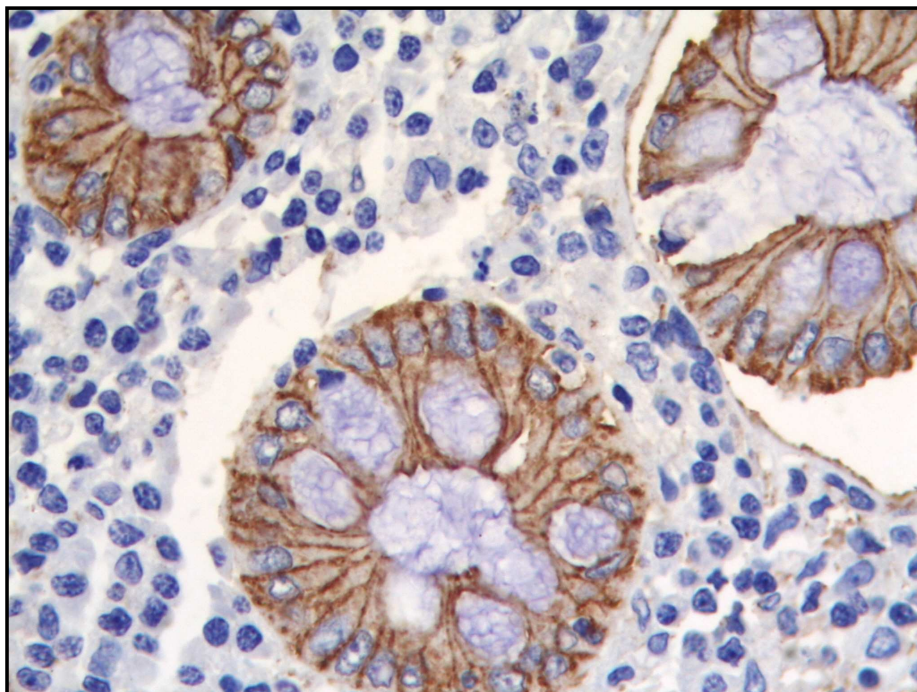


Figura 8. Corte histológico correspondiente a mucosa colónica sana, con tinción inmunohistoquímica β -catenina en citoplasma y/o membrana continua o intensa (objetivo 63x).



La valoración de la expresión de los distintos marcadores inmunohistoquímicos biomoleculares se ha llevado a cabo, de forma independiente, por dos observadores (facultativos patólogos). En caso de discordancia, fue revisado de nuevo el caso para llegar a un acuerdo por consenso y, cuando fue necesario (discrepancias mayores), se solicitó la intervención de un tercer observador independiente.

D. ESTUDIO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Una vez la base de datos completada y actualizado el seguimiento (a 31 de diciembre de 2012) hemos procedido a una descripción de los todos los parámetros clínico-patológicos convencionales (variables de confusión), supervivencia (variable dependiente) y de los marcadores biomoleculares testados en cada componente (superficial e infiltrante) de todos los CCR incluidos en el estudio.

El análisis estadístico se ha realizado mediante el software estadístico SPSS (versión 19.0).

Se ha realizado una estadística descriptiva básica inicial seguida de los análisis univariantes utilizando el test de chi-cuadrado, t-test, ANOVA o correlaciones divariados de Pearson (dependiendo de que las variables tengan carácter numérico categorizado o variables numéricas continuas). Se han usado métodos no-paramétricos (*U* de Mann–Whitney y test de Kruskal–Wallis para datos sin distribución normal. Las curvas de supervivencia se han analizado mediante el método de Kaplan–Meier, utilizándose como estadísticos de contraste el Breslow y el logrank.

Se ha considerado significativo un valor de $p < 0.05$. Finalmente, se ha realizado un análisis multivariante del tipo de regresión de Cox.

IV. RESULTADOS

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

1. VARIABLES CLÍNICO - PATOLÓGICAS

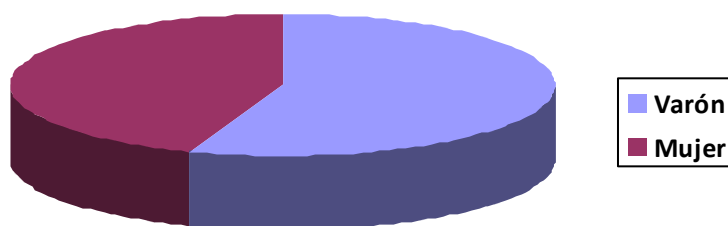
- Edad del paciente en el momento del diagnóstico

La edad media de los pacientes fue de 68 años (con un intervalo de 35 a 98 años), y con una desviación típica de 12,9.

- Sexo

El 55,4 % (92 casos de la serie) eran hombres y el 44 % (73 casos) fueron mujeres (fig. 1). En nuestra serie, el CCR es ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres.

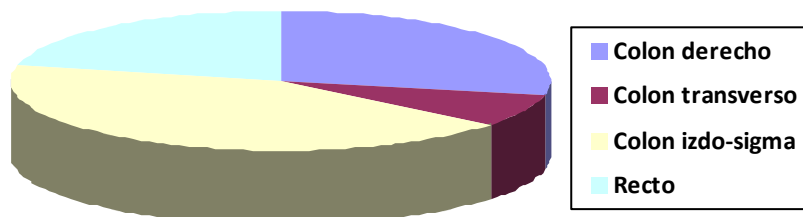
Figura 1. Distribución de los casos según el sexo de los pacientes



- Localización

El 42,6 % (69 casos de la serie) estaban localizados en el colon izquierdo – sigma, el 28,4 % (46 casos), en el colon derecho el 21,6 % (35 casos) en el recto y el 7,4 % (12 casos) se localizaron en el colon transversal (fig. 2).

Figura 2. Distribución de los casos según la localización del cáncer

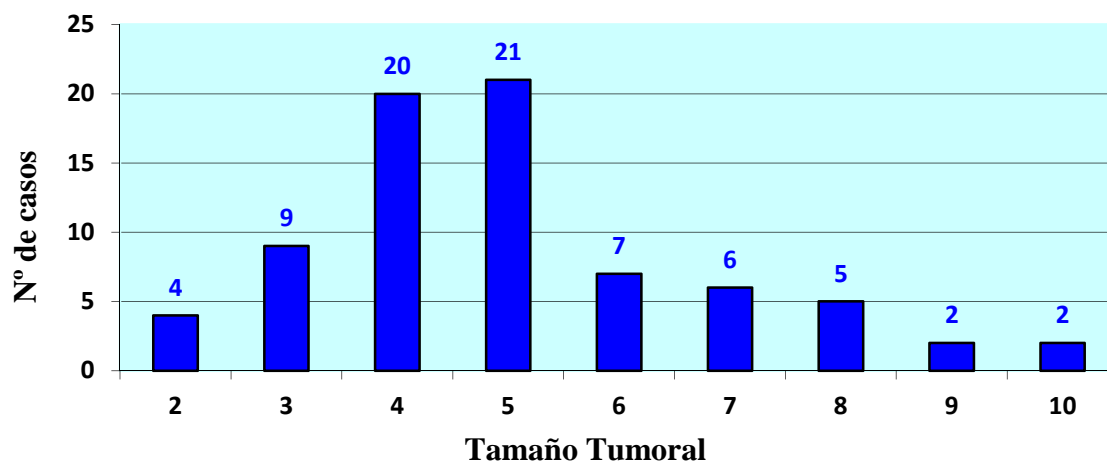


2. VARIABLES HISTO - PATOLÓGICAS

- Tamaño tumoral

El tamaño tumoral medio fue de 5 centímetros (rango de 2 a 10 cm y desviación típica de 1,79) (fig. 3).

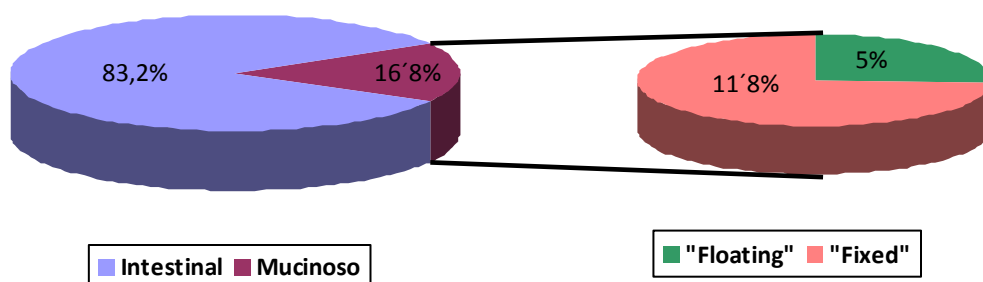
Figura 3. Número de casos en relación al tamaño tumoral



- Tipo histológico y subclasificación del componente mucinoso

El 83,2% (136 casos) fueron clasificados en el momento del diagnóstico como adenocarcinoma de tipo intestinal (convencional), el 16,8% restante (27 casos) fueron clasificados como adenocarcinoma mucinoso con/sin células en anillo de sello (no hubo casos que cumplieran requisitos de otros subtipos histológicos de adenocarcinoma). patrón que presentaron; 7 casos (5%) de subtipo “floating” y 20 casos (11,8%) de subtipo “fixed” (fig. 4).

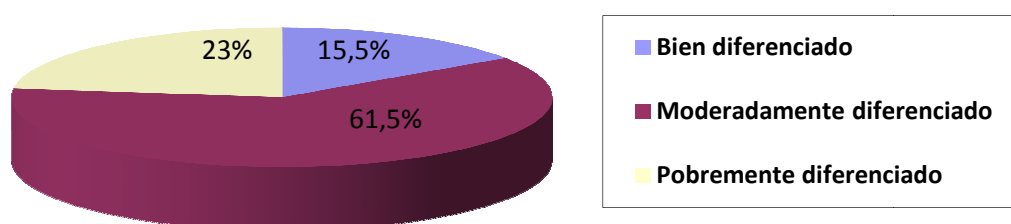
Figura 4. Distribución de los casos según el tipo histológico y el componente mucinoso



- **Grado histopatológico**

El 15,5 % (25 casos) fueron gradados en el momento del diagnóstico como “bien diferenciados”, el 61,5 % (99 casos) fueron “moderadamente diferenciados” y el 23 % (37 casos) fueron “pobremente diferenciados” (figura 5).

Fig. 5. Distribución de los casos según el grado histopatológico



- **Necrosis, infiltrado inflamatorio crónico peritumoral, fibrosis, patrón cribiforme y frente de infiltración.**

En nuestra serie, los datos de distribución muestran que la necrosis tumoral fue presentada sólo por 34 de 168 casos (20,2%); el infiltrado inflamatorio crónico peritumoral estaba presente tan solo en 17 de 167 casos (10,2%); la desmoplasia en 41 de 168 casos (24,4%) y el patrón cribiforme en 23 de 168 casos (13,7%) (tabla 1).

Con respecto al tipo de patrón histológico en el frente infiltrante, el patrón digitiforme ha sido el más frecuente en nuestra serie ya que se encuentra en 109 de 168 casos (64,9%) (tabla 2).

Tabla 1. Distribución de los casos según los hallazgos histopatológicos secundarios

| | Necrosis | | Inf. Inflamat. Crónico | | Desmoplasia | | Patrón cribiforme | |
|------------------|----------|-----|------------------------|-------|-------------|-------|-------------------|-------|
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Ausencia | 134 | 79 | 150 | 89,8 | 127 | 75,6 | 145 | 86,3 |
| Presencia | 34 | 20 | 17 | 10,2 | 41 | 24,4 | 23 | 13,7 |
| Total | 168 | 100 | 167 | 100,0 | 168 | 100,0 | 168 | 100,0 |

Tabla 2. Distribución de los casos según el tipo de frente de infiltración

| | Frente de infiltración | |
|--------------------|------------------------|-------|
| | Nº de casos | % |
| Expansivo | 59 | 35,1 |
| Digitiforme | 109 | 64,9 |
| Total | 168 | 100,0 |

- Invasión vascular y perineural

La distribución de casos con invasión vascular y perineural ha demostrado ser muy baja en nuestra serie. Tan solo 14 casos (8,8%) mostraron invasión vascular y 4 (2,5%) presentaron invasión perineural (tabla 3).

Tabla 3. Distribución de los casos según la invasión vascular y perineural

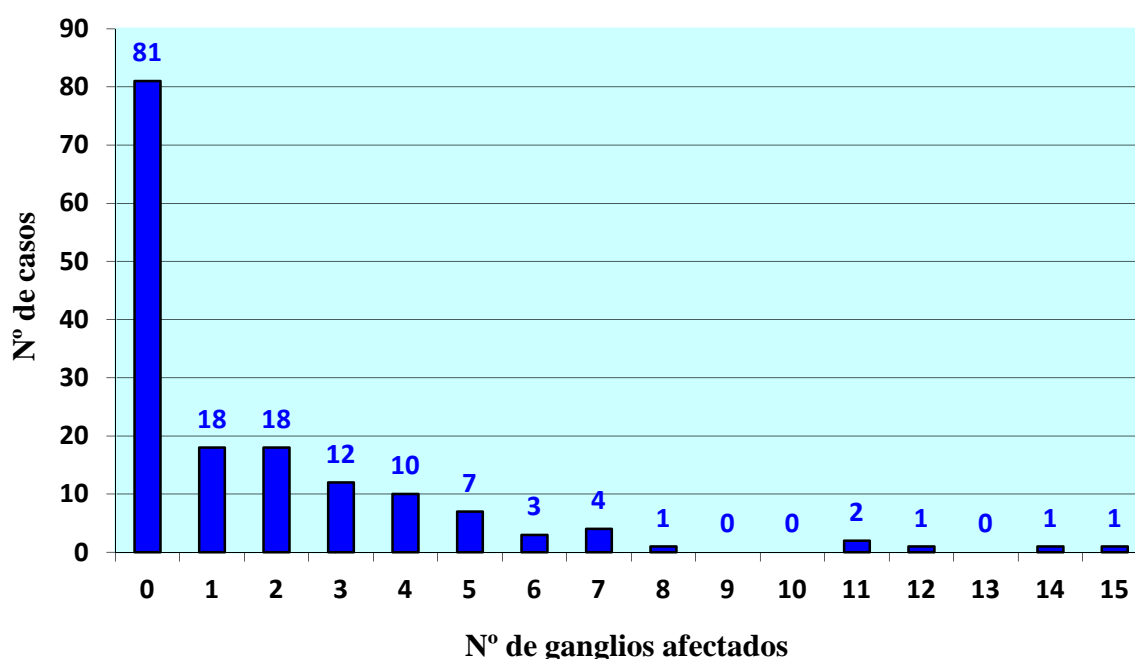
| | Invasión vascular | | Invasión perineural | |
|----------------------|-------------------|-------|---------------------|-------|
| | Nº de casos | % | Nº de casos | % |
| No precisable | 145 | 91,2 | 155 | 97,5 |
| Presencia | 14 | 8,8 | 4 | 2,5 |
| Total | 159 | 100,0 | 159 | 100,0 |

- Ganglios linfáticos resecaados y afectados

El estudio del estado de los ganglios linfáticos resecaados en nuestra serie se pudo aplicar a 159 pacientes y demostró un número medio de ganglios afectados de 1,77 (con un mínimo de 0 un máximo de 15 ganglios y una desviación típica de 2,755).

Predominaron los pacientes con ausencia de afectación ganglionar (81 casos). Cuando existe afectación ganglionar, lo más frecuente es que exista de 1 a 5 ganglios positivos (65 casos en total), mientras que los casos con afectación de 6 ganglios o más son infrecuentes (13 casos en total) (fig. 6).

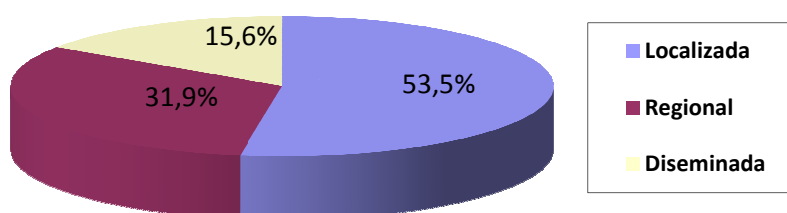
Figura 6. Número de casos en relación a los ganglios linfáticos resecados



- Extensión loco-regional

El 53,5 % (84 casos) mostraron una extensión loco-regional localizada, el 31,9 % (51 casos) presentaron extensión regional y el 15,6% (25 casos) mostraron una extensión diseminada (fig. 7).

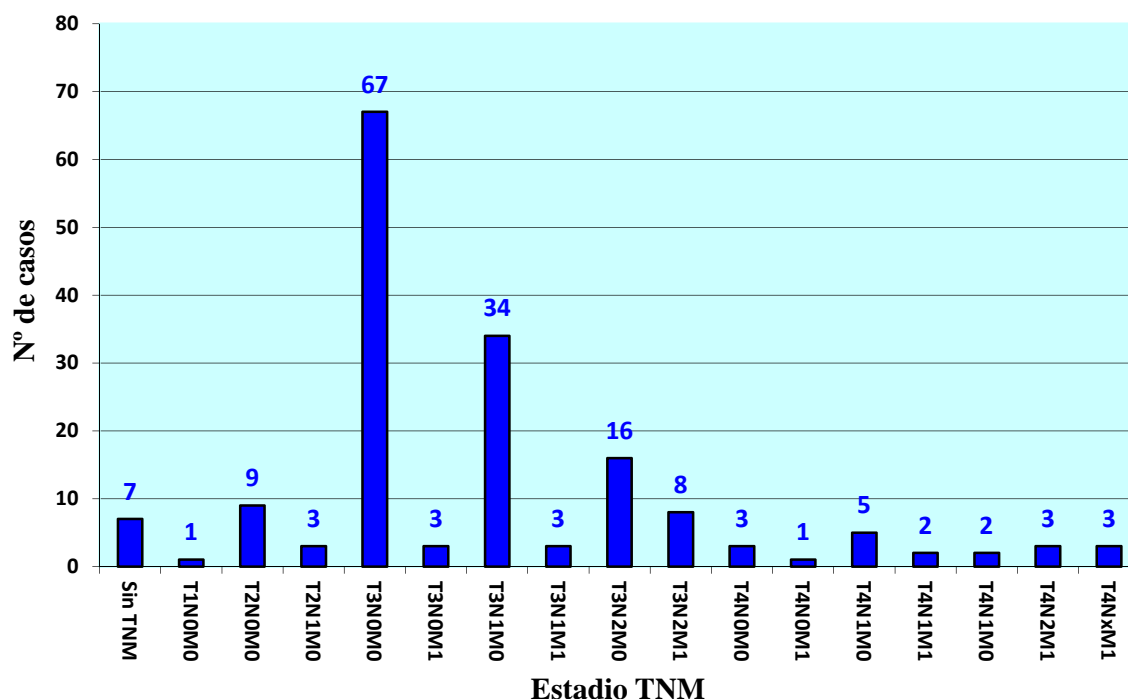
Figura 7. Distribución de los casos según la extensión loco-regional del cáncer



- Estadio de extensión TNM

Tras el estudio de la extensión TNM, el estadio más frecuente fue el T3N0M0 (con 67 casos), seguido de los T3N1M0 (34 casos) y T3N2M0 (16 casos), de lo que se deduce que el subestadio T3 es el más frecuente en el momento del diagnóstico, con/sin presencia de ganglios afectados. Además, tan solo 23 casos mostraron metástasis (M1, de los cuales 8 casos presentaron subestadios T3 y N2 (fig. 8).

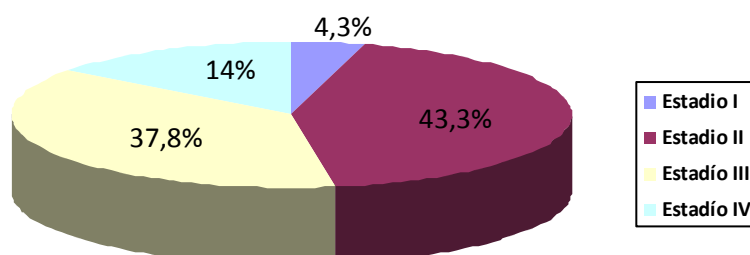
Figura 8. Número de casos en relación al estadio TNM



- Estadificación

El 4,3 % (7 casos de la serie) fueron clasificados como estadio I en el momento del diagnóstico, el 43,3 % (71 casos de la serie) como estadio II (IIA y IIB), el 37,8 % (62 casos de la serie) como estadio III (IIIA, IIIB, y IIIC) y el 14 % (24 casos de la serie) como estadio IV (fig. 9).

Figura 9. Distribución de los casos según la estadificación del cáncer

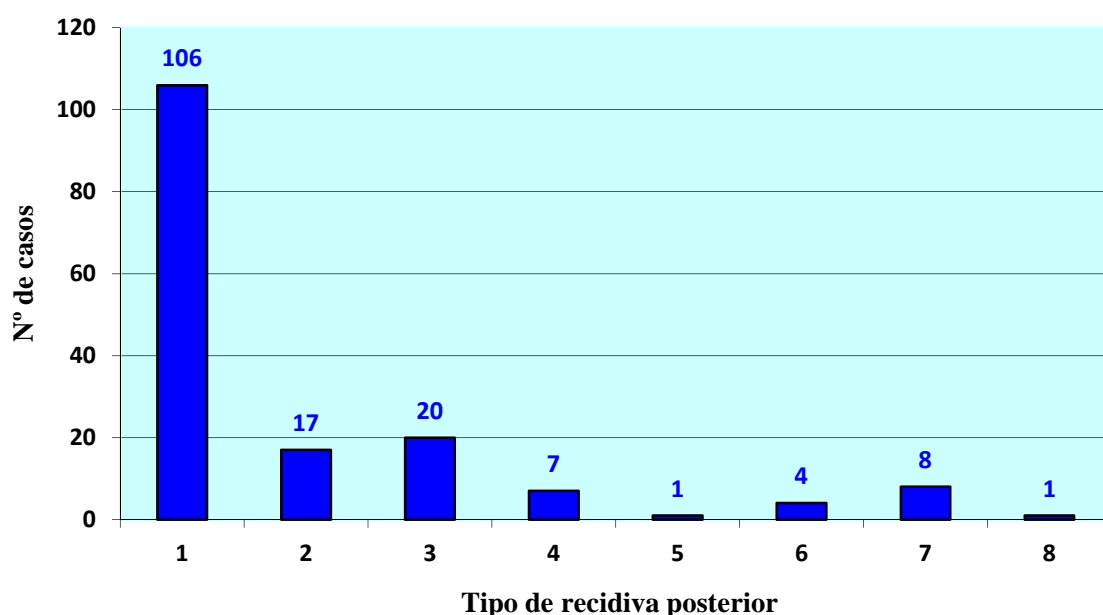


- Recidiva posterior al diagnóstico

Al estudiar el número de casos que presentaron recidiva posterior al tratamiento y el tipo de la misma, se ha constatado que la mayoría de los pacientes (106 de los 164 casos) no mostraron recidiva. De los 58 casos que sí la presentaron: 20 pacientes corresponden a recidiva en varios órganos distantes (hígado y pulmón y/u otras

localizaciones), 17 pacientes corresponden a recidiva únicamente en el hígado y 7 pacientes a recidiva sólo en el pulmón. Mientras que las recidivas en ganglios distales (5 pacientes en total) o las recidivas locales (8 casos en total) han demostrado ser infrecuentes (fig. 10).

Figura 10. Número de casos en relación a la recidiva posterior



3. VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

- P53 y Ki-67

En nuestra serie, la inmunotinción con p53 mostró una media de 33 núcleos positivos el compartimento tumoral superficial, mientras que dicho contaje disminuyó en el compartimento profundo (26 núcleos positivos, con una desviación típica de 32,8 en 153 casos). Con respecto al índice de proliferación valorado mediante la inmunoexpresión de Ki-67; ambos compartimentos tumorales, superficial y profundo, mostraron una media de tinción nuclear muy similar e inferior a p53 (24 núcleos positivos, con una desviación típica de 16 y 20, respectivamente) (tabla 4).

Tabla 4. Distribución de los casos con inmunotinción para p53 y Ki-67 según el compartimento tumoral superficial y profundo

| | | Nº de casos | Media | Mínimo | Máximo | Desv. Típ. |
|--------------|----------------------|-------------|-------|--------|--------|------------|
| P53 | C.Superficial | 158 | 33,48 | 0 | 98 | 36,189 |
| | C. Profundo | 153 | 26,92 | 0 | 98 | 32,850 |
| | M. Normal | 145 | 0,00 | 0 | 0 | 0,000 |
| Ki-67 | C. | 156 | 24,39 | 0 | 95 | 16,071 |
| | C. Profundo | 144 | 23,90 | 0 | 90 | 20,606 |
| | M. Normal | 146 | 9,62 | 0 | 38 | 6,872 |

- β -catenina

La β -catenina ha sido el marcador estudiado representativo de la vía Wnt.

En nuestra serie, se aprecia un reducido número de casos que no evidencian inmunoexpresión de β -catenina en ninguno de los dos compartimentos tumorales.

Con respecto a la positividad aumentada en la membrana, y/o en el citoplasma celular, se aprecia una ligera mayor distribución de casos en el compartimento superficial que en el profundo.

El subgrupo que muestra algún tipo de inmunotinción nuclear para β -catenina (ya sea tinción nuclear únicamente o combinada con tinción aumentada de membrana y/o citoplasma) es el que más casos agrupa; 90 casos en el compartimento superficial, y 101 casos. En los cuales; hay muy pocos casos que únicamente muestran tinción nuclear (5 casos en el compartimento superficial y 1 en el profundo). Mientras que lo más frecuente es mostrar una tinción de β -catenina en membrana y/o citoplasma aumentada con presencia de traslocación nuclear, siendo sensiblemente mayor en el compartimento profundo que en el superficial (100 y 85 casos, respectivamente) (tabla 5).

Tabla 5. Distribución de los casos según el patrón de inmunotinción de β -catenina en el compartimento tumoral superficial y en el profundo.

| | | C. Superficial | | C. Profundo | |
|-------------------|---|----------------|-------|-------------|-------|
| | | Nº de casos | % | Nº de casos | % |
| β -catenina | 1. Ausencia de tinción | 18 | 11,5 | 9 | 6,1 |
| | 2. Tinción de membrana y/o citoplasma aumentada | 49 | 31,2 | 37 | 25,2 |
| | 3. Tinción nuclear débil o focal | 4 | 2,5 | 1 | 0,7 |
| | 4. Tinción nuclear fuerte o difusa | 1 | 0,6 | 0 | 0 |
| | 2 + 3 | 72 | 45,9 | 69 | 46,9 |
| | 2 + 4 | 13 | 8,3 | 31 | 21,1 |
| | Total | 157 | 100,0 | 147 | 100,0 |

Sin embargo, la inmunoexpresión de β -catenina en la mucosa normal colónica (sana), presenta un patrón de tinción típicamente de membrana (127 casos de 147), mientras que tan solo se observó un aumento de la tinción de membrana acompañado de tinción citoplasmática en 18 casos. Naturalmente, no se evidenció ningún caso con traslocación (tinción) nuclear de β -catenina (tabla 6).

Tabla 6. Distribución de los casos según el patrón de inmunotinción de β -catenina en la mucosa normal colónica.

| | | Mucosa normal | |
|-------------------|------------------------------------|---------------|-------|
| | | Nº de casos | % |
| β -catenina | Negativo | 2 | 1,4 |
| | Positivo en membrana débil o focal | 127 | 86,4 |
| | Positivo en membrana continuo e | 18 | 12,2 |
| | Total | 147 | 100,0 |

- **PMS2, MLH-1 y MSH-2**

En nuestra serie, los marcadores de inestabilidad de microsatélites mostraron diferentes patrones de inmunoexpresión. Por ejemplo, la proteína pPMS-2 demostró ser negativa en la mayoría de los casos tanto en el compartimento tumoral superficial como en el profundo, así como en la mucosa normal (125, 108 y 107 casos, respectivamente). La proteína pMLH-1 mostró un patrón similar de tinción, si bien es sensiblemente más negativa en el compartimento tumoral profundo (96, 115 y 68 casos, respectivamente). Mientras que pMSH-2 demostró una mayor agrupación de casos positivos tanto en los dos compartimentos tumorales (131 y 112 casos, respectivamente), como en la mucosa normal (143 casos) (tabla 7).

Tabla 7. Distribución de los casos con inmunotinción para PMS2, MLH-1 y MSH-2 según el compartimento tumoral superficial y profundo

| | | C. Superficial | | C. Profundo | | Mucosa normal | |
|--------------|-----------------|----------------|-------|-------------|-------|---------------|-------|
| | | Nº de casos | % | Nº de casos | % | Nº de casos | % |
| PMS-2 | NEGATIVO | 125 | 78,6 | 108 | 75,5 | 107 | 71,8 |
| | POSITIVO | 34 | 21,4 | 35 | 24,5 | 42 | 28,2 |
| | Total | 159 | 100,0 | 143 | 100,0 | 149 | 100,0 |
| MLH-1 | NEGATIVO | 96 | 60,4 | 115 | 81,6 | 68 | 45,3 |
| | POSITIVO | 63 | 39,6 | 26 | 18,4 | 82 | 54,7 |
| | Total | 159 | 100,0 | 141 | 100,0 | 150 | 100,0 |
| MSH-2 | NEGATIVO | 26 | 16,6 | 31 | 21,7 | 5 | 3,4 |
| | POSITIVO | 131 | 83,4 | 112 | 78,3 | 143 | 96,6 |
| | Total | 157 | 100,0 | 143 | 100,0 | 148 | 100,0 |

4. SUPERVIVENCIA

- Estado del paciente en la última revisión (E.U.C.)

En nuestra serie el seguimiento de los pacientes ha sido a largo plazo (como mínimo de 10 años). En consecuencia, hemos observado un gran número de pacientes que se encuentran fallecidos en el momento de la última revisión. De los cuales, 63 casos han fallecido a consecuencia del tumor, seguido por el número de pacientes fallecidos por otras causas (45 casos). Por otra parte, tan sólo 16 pacientes siguen vivos, de los cuales 3 presentan enfermedad (debido a recidivas posteriores al diagnóstico) (tabla 9).

Tabla 9. Distribución de los casos según el estado del paciente en la última revisión

| E.U.C. | Nº de casos | % |
|--------------------------------|-------------|-------|
| Vivo, sin enfermedad | 13 | 7,8 |
| Vivo, con enfermedad | 3 | 1,8 |
| Fallecido, por causa del tumor | 63 | 38,0 |
| Fallecido, por otras causas | 45 | 27,1 |
| Pacientes perdidos para el | 42 | 25,3 |
| Total | 166 | 100,0 |

ESTADÍSTICA ANALÍTICA

La variable inmunohistoquímica principal de este estudio, la β -catenina, ha sido comparada con todas las variables clínico-patológicas, así como con las histopatológicas y con las demás variables inmunohistoquímicas. Estas relaciones se han estudiado considerando varias clasificaciones de inmunotinción. Además, se ha estudiado el grado de correspondencia entre ellas y, por último, se ha establecido las relaciones entre todas las variables y la supervivencia.

A. Correlación entre las variables clínico-patológicas y la β -catenina

Para el estudio de relación de las variables clínico-patológicas, se consideró la β -catenina reagrupada en tres patrones de inmunotinción: negativos; positivos en membrana celular y citoplasma; y positivos en membrana celular, citoplasma y núcleo.

La expresión de β -catenina, tanto en el compartimento superficial como en el profundo, tuvo fundamentalmente un patrón de inmunotinción de membrana, citoplasma y núcleo (MC, C y N), hecho común para las neoplasias tanto de varones como en mujeres (tabla 1).

Tabla 1. β -catenina en los compartimentos superficial y profundo en relación al sexo

| | | | β-catenina en compartimento tumoral superficial | | | | |
|-------|-------|---|---|---------------------|-----------------------|--------|-------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p |
| Sexo | Varón | N | 6 | 24 | 57 | 87 | 0,029 |
| | | % | 3,8% | 15,4% | 36,5% | 55,8% | |
| | Mujer | N | 12 | 25 | 32 | 69 | |
| | | % | 7,7% | 16,0% | 20,5% | 44,2% | |
| Total | | N | 18 | 49 | 89 | 156 | |
| | | % | 11,5% | 31,4% | 57,1% | 100,0% | |
| | | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | | |
| | Varón | N | 4 | 16 | 62 | 82 | n.s. |
| | | % | 2,7% | 11,0% | 42,5% | 56,2% | |
| | Mujer | N | 5 | 21 | 38 | 64 | |
| | | % | 3,4% | 14,4% | 26,0% | 43,8% | |
| Total | | N | 9 | 37 | 100 | 146 | |
| | | % | 6.2% | 25,3% | 68,5% | 10,0% | |

MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo.

La localización tumoral también ha mostrado relación significativa (p 0,000) con la β -catenina tanto en el compartimento superficial como en el profundo. El subgrupo de β -catenina negativo es mayor en el compartimento superficial y, en este, la mitad de los casos (10 de los 18 casos) se localizan en el colon derecho. La mayoría de los casos positivos para β -catenina en membrana, citoplasma y núcleo en ambos compartimentos se localizan en el colon izquierdo – sigma (50 y 52 casos, respectivamente). Y aproximadamente la mitad de los que presentan tinción aumentada de membrana y citoplasma también se localizan en colon derecho (tabla 2).

Tabla 2. β -catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con la localización

| | | | β-catenina en compartimento tumoral superficial | | | | |
|--------------|---------------------|---|---|---------------------|-----------------------|--------|-------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p |
| Localización | Co. derecho | N | 10 | 22 | 13 | 45 | 0,000 |
| | | % | 6,5% | 14,4% | 8,5% | 29,4% | |
| | Co. Transverso | N | 1 | 7 | 3 | 11 | |
| | | % | 0,7% | 4,8% | 2,0% | 7,2% | |
| | Co. Izquierdo-Sigma | N | 5 | 10 | 50 | 65 | |
| | | % | 3,3% | 6,5% | 32,7% | 100% | |
| | Recto | N | 2 | 9 | 21 | 32 | |
| | | % | 1,3% | 5,9% | 13,7% | 20,9% | |
| Total | | N | 18 | 48 | 87 | 153 | |
| | | % | 11,8% | 31,4% | 56,9% | 100,0% | |

| | | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | | | |
|--------------|----------------|---|--|-------|-------|-------|-------|--------|
| Localización | C.dch | N | 2 | 19 | 18 | 39 | 0,000 | |
| | | % | 1,4% | 13,9% | 12,7% | 27,5% | | |
| | C. Transverso | N | 3 | 5 | 3 | 11 | | |
| | | % | 2,1% | 3,5% | 2,1% | 7,7% | | |
| | C. Izqdo-Sigma | N | 2 | 7 | 52 | 61 | | |
| | | % | 1,4% | 4,9% | 36,6% | 43,0% | | |
| | Recto | N | 1 | 6 | 24 | 31 | | |
| | | % | 5´8% | 4,2% | 16,9% | 21,8% | | |
| | Total | | N | 8 | 37 | 87 | | 142 |
| | | | % | 5,8% | 26,1% | 56,9% | | 100,0% |

Co: Colon; MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

B. Correlación entre las variables histo-patológicas y la B-catenina

Los datos correspondientes al tipo histológico, necrosis, patrón cribiforme, inflamación peritumoral, desmoplasia y la invasión vascular y/o linfática, en relación con el patrón de inmunoexpresión de β -catenina, no mostraron relación estadísticamente significativa (tabla 3, 4, 5 y 6).

No obstante, es preciso comentar que, en el compartimento profundo: el tipo histológico intestinal muestra una mayor agrupación de casos en el patrón de tinción de membrana, citoplasma y núcleo (86 casos de 118). Y en el tipo mucinoso, representados en nuestra serie con un pequeño tamaño muestral, se observa una distribución similar (tabla 3).

Esto hecho se repite con las características histopatológicas de necrosis, patrón cribiforme, inflamación crónica peritumoral y desmoplasia. Si bien, esta diferencia es sensiblemente mayor en el compartimento tumoral profundo, donde se observa fundamentalmente tinción de β -catenina en MC, C y N (tabla 4 y 5).

Tabla 3. β -catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con el tipo histológico

| | | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | | |
|----------------|------------|---|--|---------------------|-----------------------|--------|------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p |
| T. Histológico | Intestinal | N | 5 | 28 | 85 | 118 | n.s. |
| | | % | 3,5% | 19,6% | 59,4% | 82,5% | |
| | Mucinoso | N | 3 | 9 | 13 | 25 | |
| | | % | 2,1% | 6,3% | 9,1% | 17,5% | |
| Total | | N | 8 | 37 | 98 | 143 | |
| | | % | 5,6% | 25,9% | 68,5% | 100,0% | |

MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

Tabla 4. β -catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con la necrosis y el patrón cribiforme

| | | | β-catenina en compartimento superficial | | | | | |
|------------|-----------|---|---|---------------------|-----------------------|--------|------|------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p | |
| Necrosis | Ausencia | N | 16 | 41 | 65 | 122 | n.s. | |
| | | % | 10,3% | 26,3% | 41,7% | 78,2% | | |
| | Presencia | N | 2 | 8 | 24 | 34 | | |
| | | % | 1,3% | 5,1% | 15,4% | 21,8% | | |
| Total | | N | 18 | 49 | 89 | 156 | n.s. | |
| | | % | 11,5% | 31,4% | 57,1% | 100,0% | | |
| Cribiforme | Ausencia | N | 16 | 44 | 75 | 135 | | n.s. |
| | | % | 10,3% | 28,2% | 48,1% | 86,5% | | |
| | Presencia | N | 2 | 5 | 14 | 21 | | |
| | | % | 1,3% | 3,2% | 9,0% | 13,5% | | |
| Total | | N | 18 | 49 | 89 | 156 | | |
| | | % | 11,5% | 31,4% | 57,1% | 100,0% | | |
| | | | β-catenina en compartimento profundo | | | | | |
| Necrosis | Ausencia | N | 7 | 32 | 76 | 115 | n.s. | |
| | | % | 4,8% | 21,9% | 52,1% | 78,8% | | |
| | Presencia | N | 2 | 5 | 24 | 31 | | |
| | | % | 1,4% | 2,4% | 16,4% | 21,2% | | |
| Total | | N | 9 | 37 | 100 | 146 | n.s. | |
| | | % | 6,2% | 25,3% | 68,5% | 100,0% | | |
| Cribiforme | Ausencia | N | 8 | 35 | 80 | 123 | | n.s. |
| | | % | 5,5% | 24,0% | 64,8% | 84,2% | | |
| | Presencia | N | 1 | 2 | 20 | 23 | | |
| | | % | 0,7% | 1,4% | 12,7% | 15,8% | | |
| Total | | N | 9 | 37 | 100 | 146 | | |
| | | % | 6,2% | 25,3% | 68,5% | 100,0% | | |

MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

Tabla 5. β -catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con la inflamación y desmoplasia

| | | | β-catenina en compartimento tumoral superficial | | | | | |
|-------------|-----------|---|---|---------------------|-----------------------|--------|------|------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p | |
| Inflamación | Ausencia | N | 16 | 43 | 79 | 138 | n.s. | |
| | | % | 10,3% | 27,7% | 51,0% | 89,0% | | |
| | Presencia | N | 2 | 6 | 9 | 17 | | |
| | | % | 1,3% | 3,9% | 5,8% | 11,0% | | |
| Total | | N | 18 | 49 | 88 | 155 | n.s. | |
| | | % | 11,6% | 31,6% | 56,8% | 100,0% | | |
| Desmoplasia | Ausencia | N | 16 | 39 | 60 | 115 | | n.s. |
| | | % | 10,3% | 25,0% | 38,5% | 73,7% | | |
| | Presencia | N | 2 | 10 | 29 | 41 | | |
| | | % | 1,3% | 6,4% | 18,6% | 26,3% | | |
| Total | | N | 18 | 49 | 89 | 156 | | |
| | | % | 11,5% | 31,4% | 57,1% | 100,0% | | |
| | | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | | | |
| Inflamación | Ausencia | N | 9 | 29 | 91 | 129 | n.s. | |
| | | % | 6,2% | 20,0% | 62,8% | 89,0% | | |
| | Presencia | N | 0 | 7 | 9 | 16 | | |
| | | % | 0,0% | 4,8% | 6,2% | 11,0% | | |
| Total | | N | 9 | 36 | 100 | 145 | n.s. | |
| | | % | 6,2% | 24,8% | 69,0% | 100,0% | | |
| Desmoplasia | Ausencia | N | 8 | 28 | 73 | 109 | | n.s. |
| | | % | 5,5% | 19,2% | 50,0% | 74,7% | | |
| | Presencia | N | 1 | 9 | 27 | 37 | | |
| | | % | 0,7% | 6,2% | 18,5% | 25,3% | | |
| Total | | N | 9 | 37 | 100 | 146 | | |
| | | % | 6,2% | 25,3% | 68,5% | 100,0% | | |

MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

Tabla 6. β -catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con la invasión vascular y perineural

| | | | β-catenina en compartimento tumoral superficial | | | | | |
|---------------|---------------|-----------|---|---------------------|-----------------------|--------|------|-------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p | |
| I. Vascular | No precisable | N | 15 | 45 | 76 | 136 | n.s. | |
| | | % | 10,1% | 30,2% | 51,0% | 91,3% | | |
| | | Presencia | N | 1 | 4 | 8 | | 13 |
| | | | % | 0,7% | 2,7% | 5,4% | | 8,7% |
| | Total | N | 16 | 49 | 84 | 149 | n.s. | |
| | | % | 10,7% | 32,9% | 56,4% | 100,0% | | |
| I. Perineural | No precisable | N | 16 | 46 | 83 | 145 | n.s. | |
| | | % | 10,7% | 30,9% | 55,7% | 97,3% | | |
| | | Presencia | N | 0 | 3 | 1 | | 4 |
| | | | % | ,0,0% | 2,0% | 0,7% | | 2,7% |
| | Total | N | 16 | 49 | 84 | 149 | n.s. | |
| | | % | 10,7% | 32,9% | 56,4% | 100,0% | | |
| | | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | | | |
| I. Vascular | No precisable | N | 9 | 34 | 86 | 129 | n.s. | |
| | | % | 6,4% | 24,3% | 61,4% | 92,1% | | |
| | | Presencia | N | 0 | 1 | 10 | | 11 |
| | | | % | 1,4% | 2,4% | 16,4% | | 21,2% |
| | Total | N | 9 | 35 | 96 | 140 | n.s. | |
| | | % | 6,4% | 24,3% | 68,6% | 100,0% | | |
| I. Perineural | No precisable | N | 9 | 34 | 95 | 138 | n.s. | |
| | | % | 6,4% | 24,3% | 67,9% | 98,6% | | |
| | | Presencia | N | 0 | 1 | 1 | | 2 |
| | | | % | 0,0% | 0,7% | 0,7% | | 1,4% |
| | Total | N | 9 | 35 | 96 | 140 | n.s. | |
| | | % | 6,4% | 25,0% | 68,6% | 100,0% | | |

I: invasión; MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

El grado de diferenciación histológica no se relaciona con la inmunoexpresión de β -catenina en el compartimento superficial, mientras que sí muestra una correlación significativa ($p = 0,048$) en el compartimento profundo. La mayoría de los casos (88 de 141) fueron diagnosticados como moderadamente diferenciados y, 66 de estos mostraron una localización predominante de β -catenina nuclear, citoplasma y membrana (tabla 7).

Tabla 7. β -catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con el grado histológico

| | | | β-catenina en compartimento tumoral superficial | | | | |
|-------|----------------------|---|---|---------------------|-----------------------|--------|-------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p |
| Grado | Bien diferenciado | N | 5 | 8 | 9 | 22 | n.s. |
| | | % | 3,3% | 5,3% | 5,9% | 14,5% | |
| | Moderadamente dif. | N | 7 | 29 | 61 | 97 | |
| | | % | 4,6% | 19,1% | 40,1% | 63,8% | |
| | Pobrementemente dif. | N | 6 | 11 | 16 | 33 | |
| | | % | 3,9% | 7,2% | 10,5% | 21,7% | |
| Total | | N | 18 | 48 | 88 | 152 | |
| | | % | 11,8% | 31,6% | 56,6% | 100,0% | |
| | | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | | |
| Grado | Bien diferenciado | N | 0 | 6 | 14 | 20 | 0,048 |
| | | % | 0,0% | 4,3% | 9,9% | 14,2% | |
| | Moderadamente dif. | N | 3 | 19 | 66 | 88 | |
| | | % | 2,1% | 13,5% | 46,8% | 62,4% | |
| | Pobrementemente dif. | N | 5 | 10 | 18 | 33 | |
| | | % | 3,5% | 7,1% | 12,8% | 23,4% | |
| Total | | N | 8 | 35 | 98 | 141 | |
| | | % | 5,7% | 24,8% | 69,5% | 100,0% | |

dif: diferenciado; MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

El tipo de frente infiltrante; expansivo o digitiforme (“budding”), también se ha correlacionado significativamente ($p = 0,032$) con la expresión de β -catenina. De los casos que mostraron un patrón digitiforme en la zona infiltrante del compartimento tumoral profundo (96 de 146), en la mayoría (74) el patrón de inmunexpresión de β -catenina fue nuclear (además de membrana y citosólica). El patrón expansivo fue menos frecuente, pero aún así también mostró un número sensiblemente mayor de casos en el subgrupo de inmunotinción nuclear (aunque esta diferencia fue menor que en el patrón digitiforme) (tabla 8).

Tabla 8. β -Catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con el frente infiltrante

| | | | β-catenina en compartimento tumoral superficial | | | | |
|--------|-------------|---|---|---------------------|-----------------------|--------|-------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p |
| Frente | Expansivo | N | 4 | 18 | 26 | 48 | 0,032 |
| | | % | 2,7 % | 12,3% | 17,8% | 32,9% | |
| | Digitiforme | N | 5 | 19 | 74 | 96 | |
| | | % | 3,4% | 13,0% | 50,7% | 67,1% | |
| Total | | N | 9 | 37 | 100 | 146 | |
| | | % | 6,2% | 25,3% | 68,5% | 100,0% | |

MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

Con respecto a la extensión loco-regional y al estadio, no se ha encontrado correlación significativa con el patrón de inmunoexpresión de β -catenina. No obstante, la mayoría de los casos que componen los estadios II y III mostraron inmunoexpresión de β -catenina nuclear (además de membrana y citosólica) (tabla 9).

Tabla 9. β -Catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con la extensión loco-regional y el estadio

| | | | β-catenina en compartimento tumoral superficial | | | | |
|---------------|-------------------|---|---|---------------------|-----------------------|--------|------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p |
| Extensión LRD | Local | N | 13 | 26 | 41 | 80 | n.s. |
| | | % | 8,6% | 17,2% | 27,2% | 53,0% | |
| | Regional | N | 4 | 15 | 29 | 48 | |
| | | % | 2,6% | 9,9% | 19,2% | 31,8% | |
| | Diseminado | N | 1 | 7 | 15 | 23 | |
| | | % | 0,7% | 9,9% | 19,2% | 31,8% | |
| Total | | N | 18 | 48 | 85 | 151 | n.s. |
| | | % | 11,9% | 31,8% | 56,3% | 100,0% | |
| Estadio | I | N | 2 | 1 | 3 | 6 | |
| | | % | 1,3% | 0,6% | 1,9% | 3,9% | |
| | IIA y IIB | N | 10 | 23 | 36 | 69 | |
| | | % | 6,5% | 14,9% | 23,4% | 44,8% | |
| | IIIA, IIIB y IIIC | N | 4 | 20 | 35 | 59 | |
| | | % | 2,6% | 13,0% | 22,7% | 38,3% | |

| | | | | | | | |
|---------------|-------------------|--|-------|-------|-------|--------|------|
| | IV | N | 1 | 5 | 14 | 20 | |
| | | % | 0,6% | 3,2% | 9,1% | 13,0% | |
| Total | | N | 17 | 49 | 88 | 154 | |
| | | % | 11,0% | 31,8% | 57,1% | 100,0% | |
| | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | | | |
| Extensión LRD | Local | N | 2 | 25 | 49 | 76 | n.s. |
| | | % | 1,4% | 17,9% | 35,0% | 54,3% | |
| | Regional | N | 4 | 8 | 29 | 41 | |
| | | % | 2´9% | 5´7% | 20,7% | 29,3% | |
| | Diseminado | N | 1 | 3 | 19 | 23 | |
| | | % | 0,7% | 2,1% | 13,6% | 16,4% | |
| Total | | N | 7 | 36 | 97 | 140 | |
| | | % | 5,0% | 25,7% | 69,3% | 100,0% | |
| Estadio | I | N | 0 | 1 | 5 | 6 | n.s. |
| | | % | 0,0% | 0,7% | 3,4% | 4,1% | |
| | IIA y IIB | N | 2 | 23 | 40 | 65 | |
| | | % | 1,4% | 15,9% | 27,6% | 44,8% | |
| | IIIA, IIIB y IIIC | N | 5 | 11 | 37 | 53 | |
| | | % | 3,4% | 7,6% | 25,5% | 36,6% | |
| | IV | N | 2 | 2 | 17 | 21 | |
| | | % | 1,4% | 1,4% | 11,7% | 14,5% | |
| Total | | N | 9 | 37 | 99 | 145 | |
| | | % | 6,2% | 25,5% | 68,3% | 100,0% | |

LRD: loco-regional diseminado; MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

El estadio TNM, estudiado globalmente, no ha mostrado diferencias con el patrón de inmunotinción de β-catenina. Al intentar correlacionar el tamaño tumoral (medido en centímetros) con la β-catenina, tampoco se observó ninguna relación significativa. No obstante, al estudiar el subgrupo T (del TNM) con la β-catenina clasificada en dos subgrupos de inmunotinción: positivo y negativo; sí se ha observado correlación significativa ($p = 0,018$) en el compartimento profundo tumoral. De tal forma que el subgrupo T3 es el que aglutina la mayoría de los casos (114 de 143), la 109 de los cuales son positivos para β-catenina (tabla 10).

Tabla 10. β -catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con la T (del TNM)

| | | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | |
|-------------|------|---|--|----------|--------|-------|
| | | | Negativo | Positivo | Total | p |
| T (del TNM) | 1,00 | N | 0 | 1 | 1 | 0,018 |
| | | % | 0,0% | 0,72% | 0,7% | |
| | 2,00 | N | 0 | 11 | 11 | |
| | | % | 0,0% | 7,7% | 7,7% | |
| | 3,00 | N | 5 | 109 | 114 | |
| | | % | 3,5% | 76,2% | 79,7% | |
| | 4,00 | N | 4 | 13 | 17 | |
| | | % | 2,8% | 9,1% | 11,9% | |
| Total | | N | 9 | 134 | 143 | |
| | | % | 6,3% | 93,7% | 100,0% | |

Las metástasis en el momento del diagnóstico (M del TNM), tampoco mostraron relación con la inmunoexpresión de β -catenina.

No obstante, los datos inferidos del seguimiento a largo plazo (como son las recidivas tumorales locales, ganglionares a distancia y en órganos) si parecen relacionarse con la expresión de β -catenina ($p = 0,008$) si reagrupamos estas recidivas en dos grandes categorías (en función de la presencia/ausencia de recidiva en órganos como el hígado, pulmón, etc.). Aunque el subgrupo de β -catenina positiva mayoritario es el de ausencia de recidiva o recidiva local/ganglionar, se aprecia como todos los casos con metástasis en órganos posteriores al diagnóstico muestran positividad para la β -catenina en el compartimento profundo del tumor primario (tabla 11).

Tabla 11. β -catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con la Recidiva posterior al diagnóstico

| | | | Recidiva posterior al diagnóstico | | | |
|---|----------|---|--|---------------------|--------|-------|
| | | | Ausencia de recidiva o recidiva local/ganglionar | Recidiva en órganos | Total | p |
| β -catenina en compartimento tumoral profundo | Negativo | N | 8 | 0 | 8 | 0,008 |
| | | % | 5,6% | 0,0% | 5,6% | |
| | Positivo | N | 98 | 38 | 136 | |
| | | % | 68,1% | 26,4% | 94,4% | |
| | Total | | 106 | 38 | 144 | |
| | | | 73,6% | 26,4% | 100,0% | |

Al intentar correlacionar la inmunoexpresión de β -catenina con la ausencia o presencia de mucina y, en su caso con el subtipo histológico: “fixed” o “floating”; hemos observado que no existe evidencia estadística en el compartimento tumoral superficial. Pero, sin embargo en el compartimento profundo sí observamos diferencias ($p = 0,006$). Aunque son pocos casos los que presentan mucina, la mayoría de los que tienen patrón “fixed” (4 de 6) mostraron tinción nuclear de β -catenina, hecho no reproducido en los casos de patrón “floating”, y una minoría (tan solo 3 del total de mucinosos) fueron negativos para β -catenina (tabla 12).

Tabla 12. β -catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con la mucina

| | | | β-catenina en compartimento tumoral superficial | | | | |
|--------|------------|---|---|---------------------|-----------------------|--------|-------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p |
| Mucina | Ausencia | N | 14 | 40 | 79 | 133 | n.s. |
| | | % | 9,0% | 25,6% | 50,6% | 85,3% | |
| | “fixed” | N | 1 | 0 | 4 | 5 | |
| | | % | 0,6% | 0,0% | 2,6% | 3,2% | |
| | “floating” | N | 3 | 9 | 6 | 18 | |
| | | % | 1,9% | 5,8% | 3,8% | 11,5% | |
| Total | | N | 18 | 49 | 89 | 156 | |
| | | % | 11,5% | 31,4% | 57,1% | 100,0% | |
| | | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | | |
| Mucina | Ausencia | N | 6 | 28 | 87 | 121 | 0,006 |
| | | % | 4,1% | 19,2,3% | 59,6% | 82,9% | |
| | “fixed” | N | 2 | 0 | 4 | 6 | |
| | | % | 1,4% | 0,0% | 2,7% | 4,1% | |
| | “floating” | N | 1 | 9 | 9 | 19 | |
| | | % | 0,7% | 6,2% | 6,2% | 13,0% | |
| Total | | N | 9 | 37 | 100 | 146 | |
| | | % | 6,2% | 25,3% | 68,5% | 100,0% | |

C. Correlación entre las variables inmunohistoquímicas y la β -catenina

La relación entre la inmunoexpresión de β -catenina y p53 se ha estudiado valorando la p53 de forma cuantitativa continua y la β -catenina reagrupada en cuatro subgrupos de inmunotinción. Esta correlación ha resultado estadísticamente significativa tanto en el compartimento tumoral superficial ($p = 0,036$), ya que la p53 mostró tener las dos medias más altas (35,90 y 38,01) de inmunotinción coincidentes en dos de los subgrupos de β -catenina: positividad en membrana y citoplasma; y membrana, citoplasma y núcleo (con un número de casos de 49 y 85, respectivamente). Con respecto al compartimento profundo, también se apreció correlación estadística ($p = 0,050$), con una distribución de casos por subgrupo de inmunotinción similar, aunque las medias observadas de p53 fueron inferiores (tabla 13A).

Al valorar la correlación entre el marcador de proliferación celular Ki-67 y la β -catenina, no se ha apreciado resultados significativos (tabla 13A).

En la clasificación anterior observamos que, si éramos estrictos a la hora de definir subgrupos de inmunotinción en función de la biología celular de β -catenina, se obtenía una distribución de casos poco práctica, ya que el subgrupo con tinción nuclear única tan sólo contenía 5 casos. Cuando reagrupamos los resultados de β -catenina en tres categorías: ausencia de tinción, tinción de membrana y/o citoplasma aumentada, y tinción de membrana, citoplasma y nuclear; tampoco observamos relación estadísticamente significativa con la expresión nuclear de p53.

Y por último, se consideraron: ausencia y presencia de inmunoexpresión de β -catenina. En este caso resultó significativo ($p = 0,008$) en el compartimento tumoral profundo. El 63,3% de los casos (92 de 144) muestran inmunoexpresión para β -catenina y p53, mientras que tan sólo el 31,3 % (45 casos) fueron negativos para p53 y positivos para β -catenina (tabla 13B).

Tabla 13A. β -catenina en el compartimento superficial y en el profundo relacionada con p53, Ki-67.

| | β -Catenina | N | Media | Desv. típica | Mínimo | Máxim | p |
|------------------------------------|--------------------------|-----|-------|--------------|--------|-------|-------|
| P53 c. tumoral superficial | Negativo | 17 | 15,76 | 24,263 | 0 | 85 | 0,036 |
| | Positivo MB y C | 49 | 35,90 | 37,624 | 0 | 94 | |
| | Positivo N | 5 | 6,00 | 13,416 | 0 | 30 | |
| | Positivo C, M y N | 85 | 38,01 | 36,883 | 0 | 98 | |
| | Total | 156 | 33,90 | 36,232 | 0 | 98 | |
| P53 c. tumoral profundo | Negativo | 17 | 12,24 | 25,126 | 0 | 83 | 0,050 |
| | Positivo MB y C | 45 | 27,18 | 34,976 | 0 | 98 | |
| | Positivo N | 4 | 0,75 | 1,500 | 0 | 3 | |
| | Positivo C, M y N | 81 | 31,96 | 33,141 | 0 | 90 | |
| | Total | 147 | 27,37 | 33,129 | 0 | 98 | |
| Ki67 c. tumoral superficial | Negativo | 17 | 21,53 | 15,191 | 0 | 54 | n.s. |
| | Positivo MB y C | 48 | 25,44 | 14,736 | 0 | 60 | |
| | Positivo N | 5 | 33,20 | 16,069 | 0 | 47 | |
| | Positivo C, M y N | 85 | 24,14 | 16,875 | 0 | 95 | |
| | Total | 155 | 24,55 | 16,002 | 0 | 95 | |
| Ki67 c. tumoral profundo | Negativo | 17 | 33,59 | 21,878 | 0 | 80 | n.s. |
| | Positivo MB y C | 36 | 23,28 | 17,832 | 0 | 65 | |
| | Positivo N | 5 | 25,40 | 28,650 | 0 | 73 | |
| | Positivo C, M y N | 82 | 22,89 | 20,996 | 0 | 90 | |
| | Total | 140 | 24,38 | 20,681 | 0 | 90 | |

c: compartimento; Desv.: desviación; MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

Tabla 13B. β -catenina en el compartimento profundo relacionada con p53

| | | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | |
|-------|----------|---|--|----------|--------|-------|
| | | | Negativo | Positivo | Total | p |
| P53 | Negativo | N | 6 | 45 | 51 | 0,008 |
| | | % | 4,2 % | 31,3% | 35,4% | |
| | Positivo | N | 1 | 92 | 93 | |
| | | % | 0,7% | 63,9% | 64,6% | |
| Total | | N | 7 | 137 | 144 | |
| | | % | 4,9% | 95,1% | 100,0% | |

Hemos intentado verificar la correlación en nuestra serie entre la vía Wnt (β -catenina) y la expresión de proteínas reparadoras. Para ello, hemos evaluado la expresión de MLH1, PMS2 y MSH2 mediante inmunohistoquímica en el compartimento superficial y en el profundo. No hemos encontrado correlación estadística entre β -catenina y dichas proteínas de expresión de proteínas reparadoras (como ejemplo, tabla 14), salvo en un subgrupo: PMS2 y β -catenina en el compartimento tumoral profundo ($p = 0,018$). En el cual, 98 casos mostraron positividad en membrana, citoplasma y núcleo; 36 casos tenían localización de β -catenina sólo en membrana y citoplasma y 6 fueron inmunohistoquímicamente negativos para β -catenina. De los que mostraron expresión de β -catenina nuclear, la pérdida de PMS2 (negativos) se asoció en un 47,9% (67 casos) y los que fueron β -catenina positivos en membrana y citoplasma también se asociaron mayoritariamente a la pérdida de PMS2 (32 casos) (tabla 15).

Tabla 14. β -catenina en el compartimento profundo relacionada con MLH1

| | | | β-catenina en compartimento tumoral profundo | | | |
|-------|----------|---|--|----------|--------|------|
| | | | Negativo | Positivo | Total | p |
| PMLH1 | Negativo | N | 4 | 109 | 113 | n.s. |
| | | % | 2,9% | 78,4% | 81,3% | |
| | Positivo | N | 0 | 26 | 26 | |
| | | % | 0,0% | 18,7% | 18,7% | |
| Total | | N | 4 | 135 | 139 | |
| | | % | 2,9% | 97,1% | 100,0% | |

Tabla 15. β -catenina en el comp. superficial y profundo relacionada con PMS2

| | | | β-catenina en compartimento tumoral superficial | | | | |
|------------------|----------|---|---|---------------------|-----------------------|--------|------|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C. | Positivo en MC, C y N | Total | p |
| PMS2 Superficial | Negativo | N | 13 | 40 | 70 | 123 | n.s. |
| | | % | 8,3% | 25,5% | 44,6% | 78,3% | |
| | Positivo | N | 5 | 9 | 20 | 34 | |
| | | % | 3,2% | 5,7% | 12,7% | 21,7% | |
| Total | | N | 18 | 49 | 90 | 157 | |
| | | % | 11,5% | 31,2% | 57,3% | 100,0% | |
| | | | B-catenina en compartimento tumoral profundo | | | | |

| | | | | | | | |
|------------------|----------|---|------|-------|-------|--------|-------|
| PMS2 Profundo | Negativo | N | 6 | 32 | 67 | 105 | 0,018 |
| | | % | 4,3% | 22,9% | 47,9% | 75,0% | |
| | Positivo | N | 0 | 4 | 31 | 35 | |
| | | % | 0,0% | 2,9% | 22,1% | 25,0% | |
| Total | | N | 6 | 36 | 98 | 140 | |
| | | % | 4,3% | 25,7% | 70,0% | 100,0% | |

MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

Al evaluar la relación entre distintos subgrupos de inmunotinción de proteínas reparadoras y β -catenina en la totalidad de los casos, observamos que la mitad (62 de 137) presentan un patrón de doble positividad para pMLH1/pPMS2 y tinción de B-catenina en MC, C y N (tabla 21).

Tabla 21. Relación entre los subgrupos de inmunoexpresión pMLH1/ pPMS2 y la B-catenina en el compartimento profundo.

| | | | B-catenina en c. profundo | | | | |
|------------------------------|---------------------|---|---------------------------|--------------------|-----------------------|--------|-----|
| | | | Negativo | Positivo en MC y C | Positivo en MC, C y N | Total | p |
| pMLH1 / pPMS2 en c. profundo | Negativo / negativo | N | 0 | 3 | 19 | 22 | n.s |
| | | % | ,0% | 2,2% | 13,9% | 16,1% | |
| | Positivo / negativo | N | 0 | 1 | 14 | 15 | |
| | | % | ,0% | ,7% | 10,2% | 10,9% | |
| | Negativo / positivo | N | 0 | 1 | 3 | 4 | |
| | | % | ,0% | ,7% | 2,2% | 2,9% | |
| | Positivo / positivo | N | 4 | 30 | 62 | 96 | |
| | | % | 2,9% | 21,9% | 45,3% | 70,1% | |
| Total | | N | 4 | 35 | 98 | 137 | |
| | | % | 2,9% | 25,5% | 71,5% | 100,0% | |

p = proteína; MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

El estadio lo hemos correlacionado con la inmunoexpresión de p53 y de β -catenina considerando distintas clasificaciones. Al estudiar la p53, en el componente profundo, con punto de corte en 30 núcleos positivos (por ser este un valor aproximado a la media) y correlacionarla con la β -catenina (subdividida en 3 categorías) por estadios; no hemos demostrado relación significativa (tabla 16A).

Tabla 16A.- β -catenina en el comp. profundo relacionada con p53 y estadio

| P53 en c. profundo | β -Catenina c. profundo | | Estadios | | | | Total | p |
|--------------------|-------------------------------|---|----------|-----------|-------------------|-------|--------|------|
| | | | I | IIA y IIB | IIIA, IIIB y IIIC | IV | | |
| <30 | Negativo | N | 0 | 1 | 4 | 1 | 6 | n.s. |
| | | % | 0,0% | 1,1% | 4,6% | 1,1% | 6,9% | |
| | Positivo en MC y C | N | 1 | 20 | 7 | 1 | 29 | |
| | | % | 1,1% | 22,0% | 8,0% | 1,1% | 33,3% | |
| | Positivo en MC, C y N | N | 3 | 24 | 15 | 10 | 52 | |
| | | % | 3,4% | 27,6% | 17,2% | 11,5% | 59,8% | |
| >30 | Negativo | N | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 | n.s. |
| | | % | 0,0% | 1,7% | 1,7% | 1,7% | 5,2% | |
| | Positivo en MC y C | N | 0 | 3 | 4 | 1 | 8 | |
| | | % | 0,0% | 5,2% | 6,9% | 1,7% | 13,8% | |
| | Positivo en MC, C y N | N | 2 | 16 | 22 | 7 | 47 | |
| | | % | 3,4% | 27,6% | 37,9% | 12,1% | 81,0% | |
| Total | Negativo | N | 0 | 2 | 5 | 2 | 9 | n.s. |
| | | % | 0,0% | 1,4% | 3,4% | 1,4% | 6,2% | |
| | Positivo en MC y C | N | 1 | 23 | 11 | 2 | 37 | |
| | | % | 0,7% | 15,9% | 7,6% | 1,4% | 25,5% | |
| | Positivo en MC, C y N | N | 5 | 40 | 37 | 17 | 99 | |
| | | % | 3,4% | 27,6% | 25,5% | 11,7% | 68,3% | |
| | Total | N | 6 | 65 | 53 | 21 | 145 | n.s. |
| | | % | 4,1% | 44,8% | 36,6% | 14,5% | 100,0% | |

c: compartimento; MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

Al reagrupar los valores de p53 y β -catenina (en dos patrones de inmunotinción: positivos y negativos); si se aprecia una correlación estadísticamente significativa ($p = 0,009$) en los estadios III, ya que 35 de 48 casos mostraron doble positividad para p53 y β -catenina en el compartimento tumoral profundo (tabla 16B).

Tabla 16B. β -catenina en el comp. profundo relacionada con p53 y estadio

| | | | | β-catenina en c. profundo | | | |
|-------------------|--------------------|----------|---|---------------------------|----------|--------|-------|
| Estadios | | | | Negativo | Positivo | Total | p |
| I | P53 en c. profundo | Negativo | N | | 3 | 3 | |
| | | | % | | 60,0% | 60,0% | |
| | | Positivo | N | | 2 | 2 | |
| | | | % | | 40,0% | 40,0% | |
| | Total | | N | | 5 | 6 | |
| | | | % | | 100,0% | 100,0% | |
| IIA y IIB | P53 en c. profundo | Negativo | N | 1 | 22 | 23 | n.s |
| | | | % | 1,6% | 34,4% | 35,9% | |
| | | Positivo | N | 0 | 41 | 41 | |
| | | | % | 0,0% | 64,1% | 64,1% | |
| | Total | | N | 1 | 63 | 64 | |
| | | | % | 1,6% | 98,4% | 100,0% | |
| IIIA, IIIB y IIIC | P53 en c. profundo | Negativo | N | 4 | 13 | 17 | 0,009 |
| | | | % | 7,7% | 25,0% | 32,7% | |
| | | Positivo | N | 0 | 35 | 35 | |
| | | | % | 0,0% | 67,3% | 67,3% | |
| | Total | | N | 4 | 48 | 52 | |
| | | | % | 7,7% | 92,3% | 100,0% | |
| IV | P53 en c. profundo | Negativo | N | 1 | 7 | 8 | n.s, |
| | | | % | 4,8% | 33,3% | 38,1% | |
| | | Positivo | N | 1 | 12 | 13 | |
| | | | % | 4,8% | 57,1% | 61,9% | |
| | Total | | N | 2 | 19 | 21 | |
| | | | % | 9,5% | 90,5% | 100,0% | |
| Total | P53 en c. profundo | Negativo | N | 6 | 45 | 51 | 0,009 |
| | | | % | 4,2% | 31,7% | 35,9% | |
| | | Positivo | N | 1 | 90 | 91 | |
| | | | % | 0,7% | 63,4% | 64,1% | |
| | Total | | N | 7 | 135 | 142 | |
| | | | % | 4,9% | 96,1% | 100,0% | |

c: compartimento

D. Correlaciones entre otras variables.

Al estudiar la relación entre el tipo histológico tumoral y la inmunexpresión de p53, se ha elegido una valoración del tipo histológico en dos subgrupos: intestinal y mucinoso; y la inmunexpresión nuclear de p53 se ha reagrupado en dos subgrupos, usando el punto de corte en 30 núcleos. De esta forma hemos encontrado una relación estadísticamente significativa tanto en el compartimento superficial como en el profundo ($p = 0,021$ y $0,019$, respectivamente) (tabla 16).

En esta correlación se aprecia que en ambos compartimentos, los dos subgrupos del tipo histológico (intestinal y mucinoso) suelen agrupar los casos en un valor de p53 inferior a 30 núcleos positivos. Siendo esta diferencia mucho más patente en los escasos casos del subgrupo mucinoso. Además, se aprecia que en el compartimento profundo aumenta el número de casos con p53 inferior a 30 (tabla 17).

Cuando se ha intentado reproducir este evento entre los subtipos del tipo histológico mucinoso (“floating” y “fixed”) no se ha obtenido correlación significativa.

Tabla 17. Tipo histológico en el compartimento superficial y profundo relacionada con p53

| | | | P53 en el compartimento superficial | | | |
|------------------|------------|---|-------------------------------------|-------|--------|-------|
| | | | <30 | >30 | Total | p |
| Tipo histológico | Intestinal | N | 69 | 67 | 136 | 0,021 |
| | | % | 42,3% | 41,1% | 83,4% | |
| | Mucinoso | N | 20 | 7 | 27 | |
| | | % | 12,2% | 4,3% | 16,6% | |
| Total | | N | 89 | 74 | 163 | |
| | | % | 54,6% | 45,4% | 100,0% | |

| | | | P53 en el compartimento profundo | | | |
|------------------|------------|---|----------------------------------|-------|--------|-------|
| Tipo histológico | Intestinal | N | 74 | 62 | 136 | 0,019 |
| | | % | 45,4% | 38,0% | 83,4% | |
| | Mucinoso | N | 21 | 6 | 27 | |
| | | % | 12,9% | 3,7% | 16,6% | |
| Total | | N | 96 | 68 | 163 | |
| | | % | 58,3% | 41,7% | 100,0% | |

Sin embargo, al correlacionar los subtipos mucinosos con la extensión loco-regional sí se ha observado significación estadística ($p = 0,05$). Ya que la mayoría de casos clasificados con extensión loco-regional de tipo local o regional corresponden al subtipo “floating” (10 de 12 casos con LRD local y 8 de 10 con LRD regional), mientras que tan sólo hay 4 casos con LRD diseminado, y 3 de ellos mostraron un patrón “fixed” (tabla 18).

Tabla 18. Subtipo histológico de mucina en el compartimento profundo relacionada con la extensión LRD

| | | | Subtipo histológico de mucina en compartimento profundo | | | |
|---------------|------------|---|---|------------|--------|------|
| | | | “fixed” | “floating” | Total | p |
| Extensión LRD | Local | N | 2 | 10 | 12 | 0,05 |
| | | % | 77% | 38,5% | 46,2% | |
| | Regional | N | 2 | 8 | 10 | |
| | | % | 7,7% | 30,8% | 38,5% | |
| | Diseminado | N | 3 | 1 | 4 | |
| | | % | 11,5% | 3,8% | 15,4% | |
| Total | | N | 7 | 19 | 26 | |
| | | % | 26,9% | 73,1% | 100,0% | |

LRD: loco-regional

El tipo de frente infiltrante también muestra correlación significativa con la recidiva posterior al diagnóstico ($p = 0,038$) cuando esta se codifica en dos subgrupos: ausencia y presencia. Ya que ante la presencia de recidiva, la mayoría de los tumores primarios (46 casos de 62) mostraron un tipo de frente digitiforme. Mientras que esta diferencia, aunque presente, no es tan evidente en los pacientes que no mostraron recidiva (tabla 19).

Tabla 19. Recidiva posterior al diagnóstico relacionada con el frente infiltrante

| | | | Frente infiltrante | | | |
|-------------------|-----------|---|--------------------|-------------|--------|-------|
| | | | Expansivo | Digitiforme | Total | p |
| Recidiva post-dx. | Ausencia | N | 43 | 63 | 105 | 0,038 |
| | | % | 25,6% | 37,5% | 63,1% | |
| | Presencia | N | 16 | 46 | 62 | |
| | | % | 9,5% | 27,4% | 36,9% | |
| Total | | N | 59 | 109 | 168 | |
| | | % | 35,1% | 64,9% | 100,0% | |

Post. dx: posterior al diagnóstico

Hemos intentado establecer que patrón inmunohistoquímico de proteínas reparadoras había en relación con el subgrupo de adenocarcinomas mucinosos. Y hemos observado una correlación ($p = 0,021$) entre la pMLH-1 y pPMS-2 en el compartimento profundo, ya que la mayoría de casos (17 de 23) son doblemente negativos (tabla 20). Las correlaciones posibles con la otra proteína reparadora pMLH-6 no han mostrado resultados significativos, así como tampoco se ha apreciado esta relación en el subgrupo intestinal.

Tabla 20. Relación entre pMLH1 y pPMS2 en el subgrupo de Adenocarcinoma mucinoso

| | | | pPMS2 | | | |
|-------|----------|---|----------|----------|--------|-------|
| | | | Negativo | Positivo | Total | p |
| pMLH1 | Negativo | N | 17 | 2 | 19 | 0,021 |
| | | % | 73,9% | 8,7% | 82,6% | |
| | Positivo | N | 1 | 3 | 4 | |
| | | % | 4,3% | 13,0% | 17,4% | |
| Total | | N | 18 | 5 | 23 | |
| | | % | 73,3% | 21,7% | 100,0% | |

p = proteína

E. Estudio de supervivencia

Los datos inferidos del seguimiento a 15 años de los pacientes de este estudio han mostrado una estimación de la media de supervivencia de 91,097 meses, con una mediana de 50,8 (tabla 22).

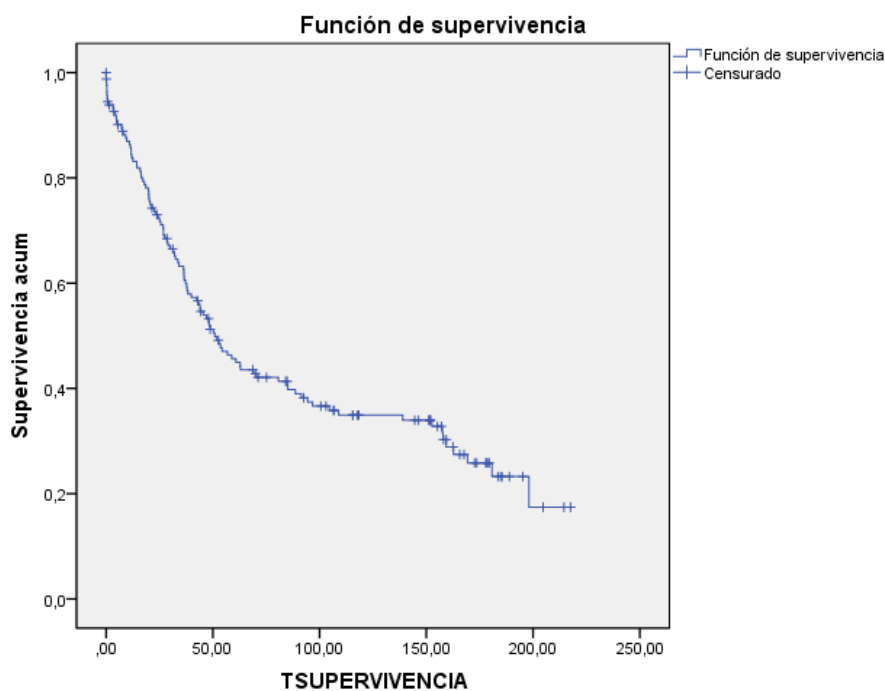
Tabla 22.- Media y mediana de supervivencia global

| Media | | | |
|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | Límite inferior | Límite superior |
| 91,097 | 6,844 | 77,683 | 104,511 |

| Mediana | | | |
|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | Límite inferior | Límite superior |
| 50,870 | 6,444 | 38,239 | 63,501 |

En la curva de supervivencia global, se puede observar como a los 198 meses, tan solo sobreviven el 17,8 % de los pacientes (fig. 1).

Figura 1. Supervivencia global



Sin embargo, al tener en cuenta sólo los pacientes clasificados según el E.U.C. como “fallecidos por causa del tumor” o muerte específica por el tumor; los datos inferidos del seguimiento mostraron una estimación de la media de supervivencia mayor; de 128,849 meses, con una mediana de 180,770 (tabla 23).

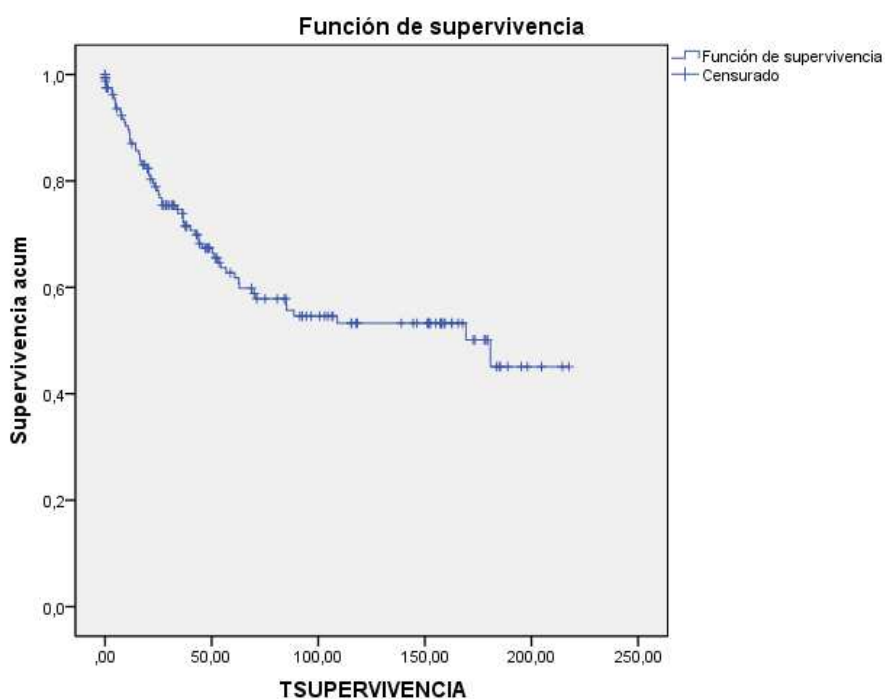
Tabla 23. Media y mediana de supervivencia global específica

| Media | | | |
|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | Límite inferior | Límite superior |
| 128,849 | 8,275 | 112,630 | 145,069 |

| Mediana | |
|------------|--------------|
| Estimación | Error típico |
| 180,770 | 6,444 |

En la curva de supervivencia por muerte específica por el tumor, se puede observar como a los 181 meses, sobreviven el 45 % de los pacientes (fig. 2).

Figura 2. Supervivencia global específica



Ya que este estudio se basa en correlacionar distintas variables con la supervivencia (pronóstico y mortalidad) de los pacientes con carcinoma colo-rectal, nos centraremos en los pacientes que fallecieron exclusivamente por causa del tumor (subgrupo más numeroso de nuestra serie).

1. Variables clínico-patológicas

- **Edad.** La estimación de la media de supervivencia es menor (85,403; con una mediana de 56,8) en pacientes de menos de 50 años; mientras que los subgrupos de 50 a 70 años y los mayores de 70 años muestran estimaciones de media de supervivencia superiores y semejantes (132,16 y 129,29 meses, respectivamente) (tabla 24).

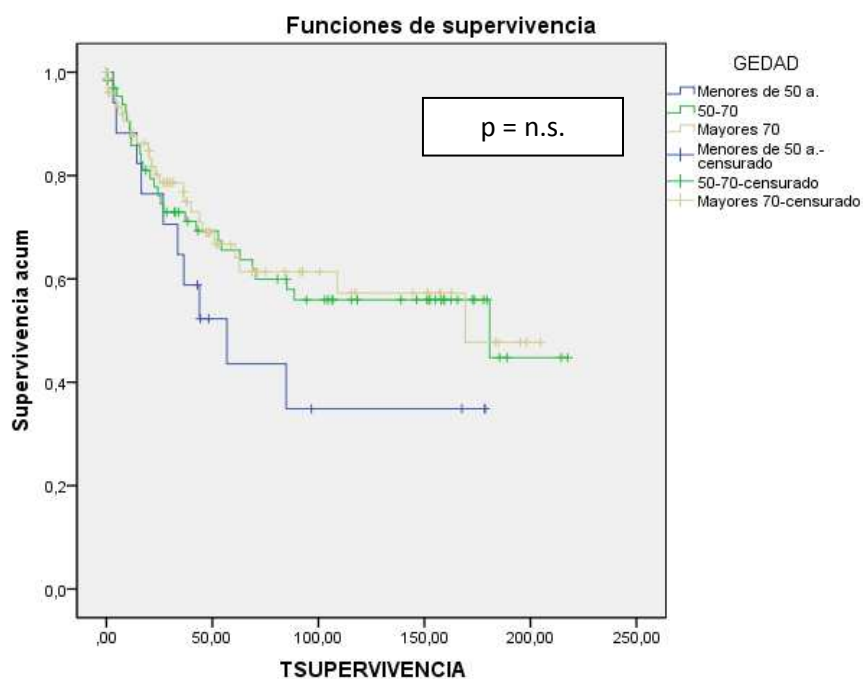
Tabla 24. Media y mediana de la supervivencia en función de la edad

| EDAD | Media | | | |
|------------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Menores de 50 a. | 85,403 | 18,453 | 49,236 | 121,570 |
| 50-70 | 132,162 | 12,255 | 108,143 | 156,181 |
| Mayores 70 | 129,294 | 11,748 | 106,268 | 152,321 |
| Global | 129,682 | 8,303 | 113,409 | 145,955 |

| EDAD | Mediana | | | |
|------------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Menores de 50 a. | 56,870 | 17,304 | 22,954 | 90,786 |
| 50-70 | 180,770 | 93,134 | ,000 | 363,313 |
| Mayores 70 | 169,270 | . | . | . |
| Global | 180,770 | . | . | . |

La supervivencia específica en función de la edad muestra una superposición entre los subgrupos de 50-70 años y los mayores de 70 años; ya que a los 181 meses, sobreviven el 44´8% de los pacientes entre 50-70 años, y el 47,7% de los mayores de 70 años. En los pacientes más jóvenes (menores a 50 años) la probabilidad de supervivencia es mucho menor, sobreviviendo tan solo el 34´4% (fig. 3).

Figura 3. Supervivencia global específica relacionada con la edad



- **Sexo.** La media de supervivencia es menor en mujeres (122,197; con una mediana de 169); mientras que en los varones aumenta en 11 meses (133,9) (tabla 25).

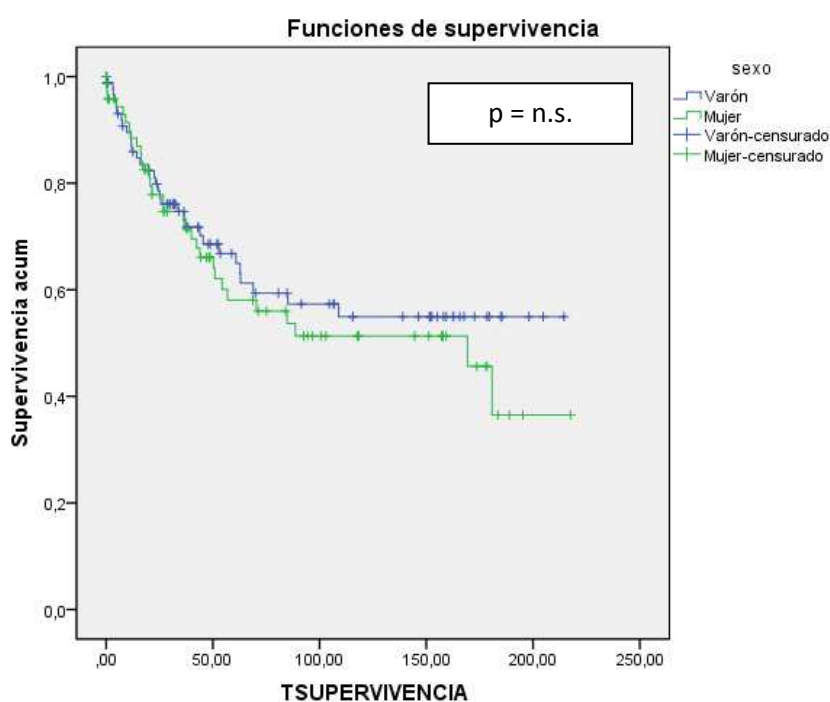
Tabla 25.- Media y mediana de supervivencia en función del sexo

| sexo | Media | | | | Mediana | |
|-------|------------|--------------|-------------------------------|---------|------------|--------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | | Estimación | Error típico |
| | | | Límite inferior | Límite | | |
| Varón | 133,904 | 10,968 | 112,408 | 155,401 | . | . |
| Mujer | 122,197 | 12,050 | 98,580 | 145,815 | 169,270 | 45,650 |
| Globa | 128,849 | 8,275 | 112,630 | 145,069 | 180,770 | . |

| sexo | Mediana | |
|--------|-------------------------------|-----------------|
| | Intervalo de confianza al 95% | |
| | Límite inferior | Límite superior |
| Varón | . | . |
| Mujer | 79,797 | 258,743 |
| Global | . | . |

Las curvas de supervivencia específica en mujeres y hombres en los primeros años de seguimiento son muy similares entre sí, con una supervivencia ligeramente superior en los varones que en las mujeres entre los 4 y 13 años. No obstante, a los 18 años sobreviven el 54,9% de los varones, y el 36,5% de las mujeres. (fig. 4).

Figura 4. Supervivencia global específica relacionada con el sexo



- **Localización del tumor.** La media de supervivencia son muy parecidas para pacientes con tumores en colon derecho, transverso e izquierdo – sigma oscilando entre 115,343 y 119,638 meses), mientras que la estimación de la media es ligeramente mayor (131,05) en el recto (tabla 26).

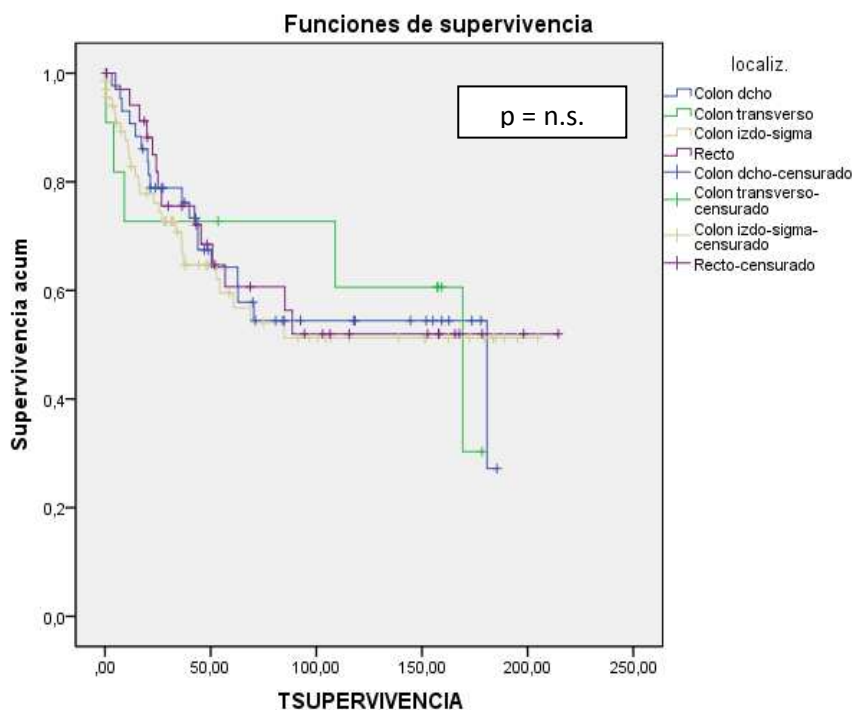
Tabla 26. Media y mediana de supervivencia en función de la localización

| Localización | Media | | | |
|------------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Colon dcho. | 115,343 | 12,480 | 90,883 | 139,804 |
| Colon transverso | 119,828 | 22,552 | 75,625 | 164,030 |
| Colon izdo.- | 119,638 | 12,479 | 95,178 | 144,098 |
| Recto | 131,057 | 16,554 | 98,612 | 163,502 |
| Global | 125,825 | 8,212 | 109,729 | 141,920 |

| Localización | Mediana | | | |
|--------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Colon dcho. | 180,770 | 75,827 | 32,149 | 329,391 |
| Colon | 169,270 | 45,475 | 80,139 | 258,401 |
| Colon izdo.- | . | . | . | . |
| Recto | . | . | . | . |
| Global | 169,270 | 42,035 | 86,882 | 251,658 |

Las curvas de supervivencia específica son muy similares en el colon derecho, izquierdo – sigma y recto, mientras que difiere un poco en los escasos casos del colon transversal. No obstante, a los 15 años, sobreviven el 52% de las localizaciones rectales, el 18% de los pacientes con tumores en localizaciones izquierdo – sigma; el 30,3% de los pacientes con localización transversal y el 27,2% de colon derecho (fig. 5).

Figura 5. Supervivencia específica según la localización



2. Variables histo-patológicas

- **Inmunoexpresión de β -catenina.** Al estudiar de forma específica la supervivencia de los casos con diferente patrón de inmunoexpresión de β -catenina, observamos que la presencia de β -catenina (positividad para membrana celular y citoplasma aumentada; y positividad para membrana, citoplasma y núcleo) se relaciona con estimaciones de media inferiores al subgrupo con β -catenina negativa (122,968; 120,348 y 145,562 meses, respectivamente) (tabla 27).

Las curvas de supervivencia muestran que la traslocación nuclear de β -catenina se asocia a la peor supervivencia de los tres subgrupos de inmunotinción, de tal forma que a los 200 meses sobreviven el 46,1% de los pacientes. Aunque la positividad de β -catenina sólo en citoplasma y/o membrana muestra una curva ligeramente superior a la anterior, el último paciente que fallece provoca que tan sólo sobrevivan el 30% de los pacientes. Por último, los pacientes que muestran negatividad para β -catenina son los que mejor curva de supervivencia muestran, sobreviviendo el 64% de los mismos (fig. 6).

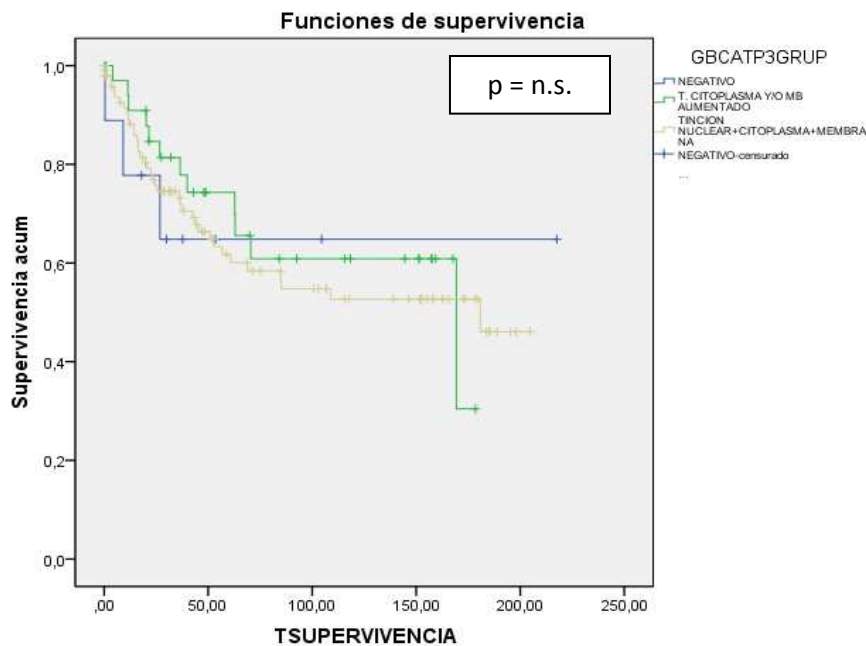
Tabla 27. Media y mediana de la supervivencia en función de la inmunoexpresión de β -catenina

| β -catenina en el compartimento profundo | Media | | | |
|--|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Negativo | 145,562 | 33,748 | 79,416 | 211,709 |
| Positivo MC y C | 120,348 | 13,041 | 94,787 | 145,909 |
| Positivo MC, C y N. | 122,968 | 9,868 | 103,627 | 142,309 |
| Global | 131,584 | 8,858 | 114,223 | 148,946 |

MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

| β -catenina en el compartimento profundo | Mediana | | | |
|--|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Negativo | . | . | . | . |
| Positivo MC y C | 169,270 | 71,560 | 29,012 | 309,528 |
| Positivo MC, C y N | 180,770 | . | . | . |
| Global | 180,770 | . | . | . |

Figura 6. Supervivencia específica según la inmunoexpresión de β -catenina



- **Supervivencia en relación con la β -catenina en compartimento superficial/profundo.** Cuando seleccionamos los pacientes según el patrón de inmunotinción en el compartimento superficial y lo que ocurre en el compartimento profundo, se aprecia que la presencia de β -catenina nuclear en el compartimento profundo muestra peor pronóstico (figura 7A, B y C).

Esto es patente independientemente del patrón de inmunotinción en el compartimento superficial. Aunque la curva de supervivencia más baja corresponde al subgrupo que muestra presencia de β -catenina en membrana y citoplasma en el compartimento superficial y traslocación al núcleo en el compartimento profundo. (figura 7B).

Figura 7A. Supervivencia específica según la β -catenina negativa en compartimento superficial relacionada con la β -catenina en el compartimento profundo

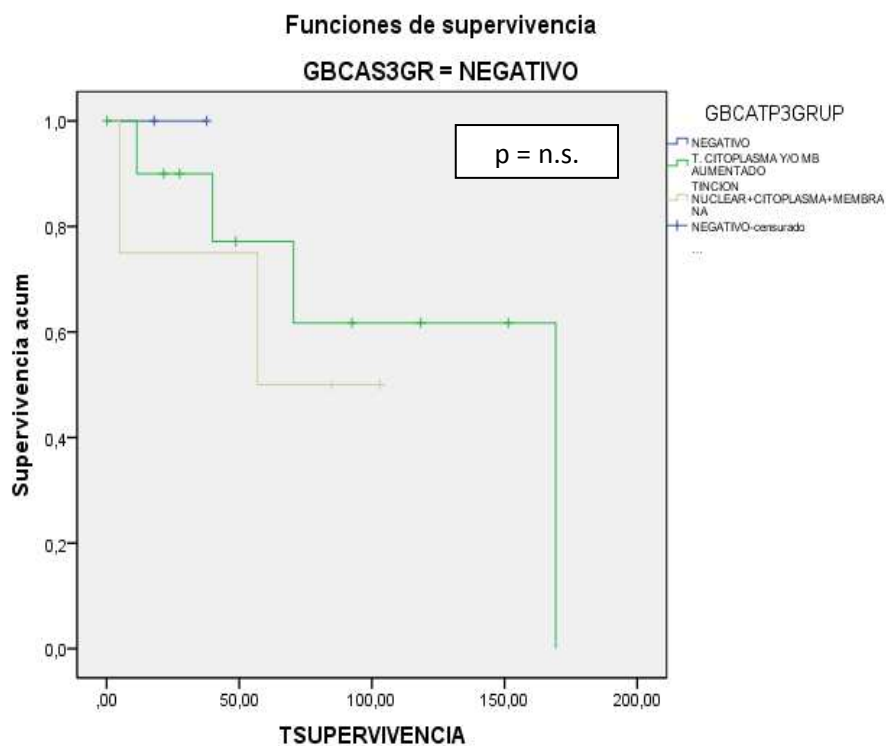


Figura 7B. Supervivencia específica según la β -catenina en citoplasma y/o membrana aumentada en compartimento superficial relacionada con la β -catenina en el compartimento profundo

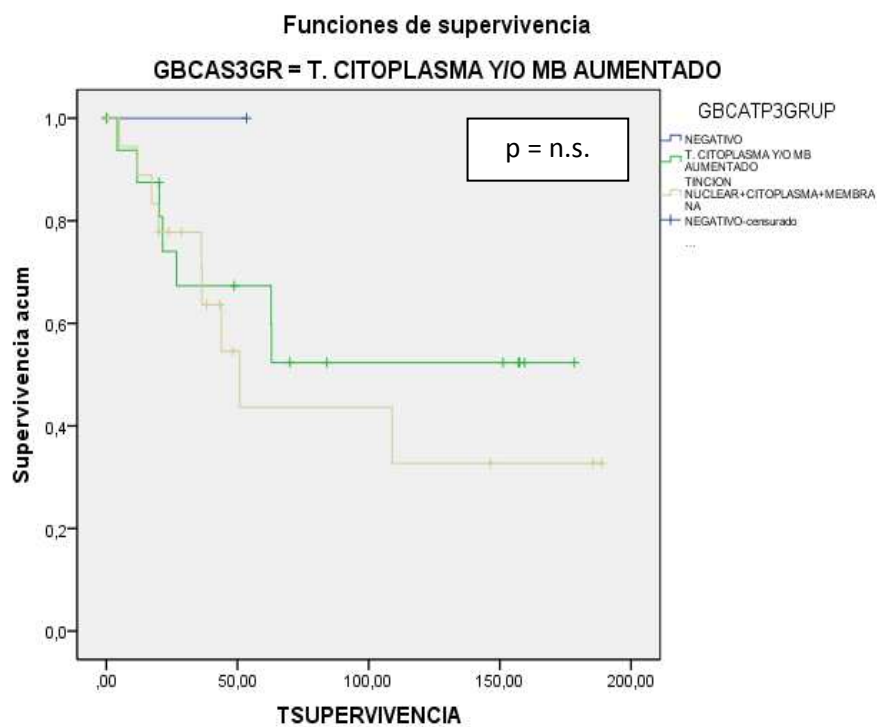
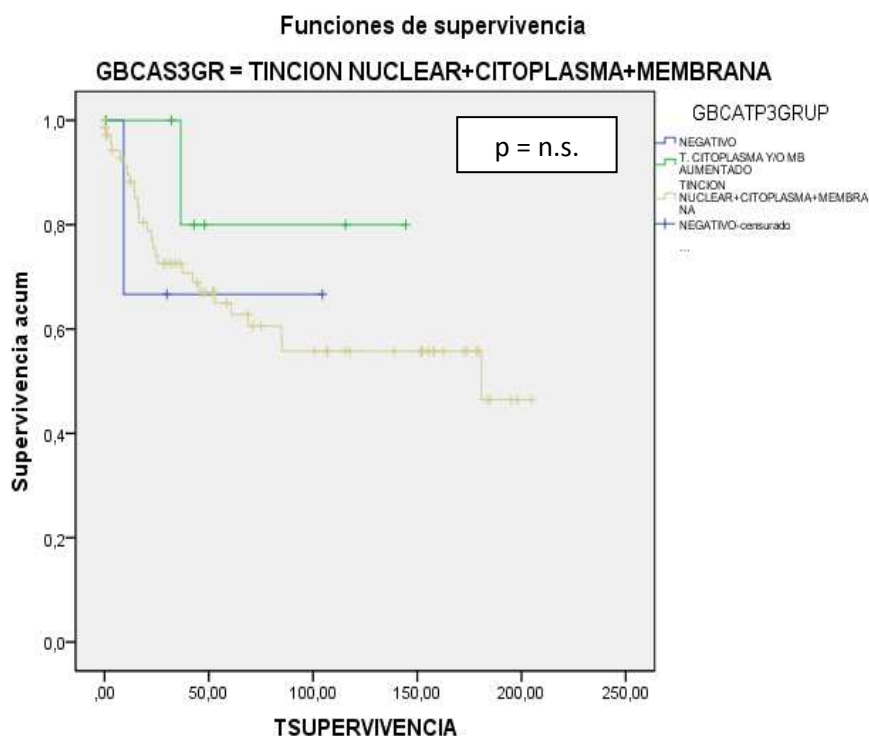


Figura 7C. Supervivencia específica según la β -catenina en núcleo, citoplasma y/o membrana aumentada en compartimento superficial relacionada con la β -catenina en el compartimento profundo



- **Tipo histológico.** El tipo intestinal ha demostrado una estimación de media de supervivencia superior a la presentada por el tipo mucinoso (130,932 y 102,572 meses, respectivamente) (tabla 28).

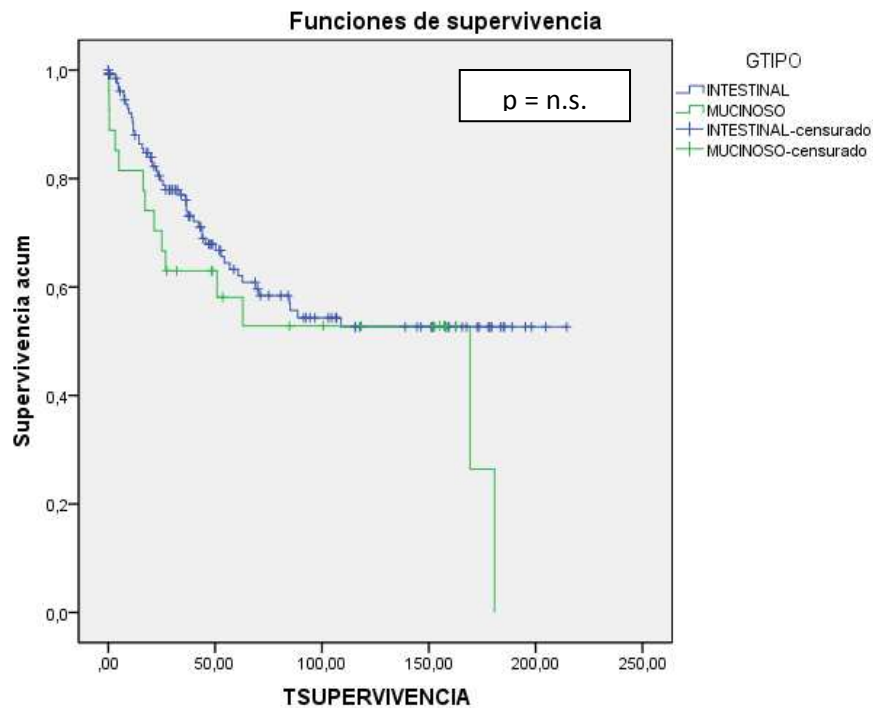
Tabla 28. Media y mediana de la supervivencia en función del tipo histológico

| Tipo Histológico | Media | | | | Mediana | |
|------------------|------------|--------------|-------------------------------|---------|------------|--------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | | Estimación | Error típico |
| | | | Límite inferior | Límite | | |
| INTESTINAL | 130,932 | 8,994 | 113,303 | 148,560 | . | . |
| MUCINOSO | 102,572 | 16,284 | 70,655 | 134,489 | 169,270 | 72,323 |
| Global | 126,506 | 8,176 | 110,481 | 142,532 | 169,270 | 45,875 |

Con respecto a las curvas de supervivencia, ambos tipos histológicos muestran una disminución drástica de la misma entre los 0 y 60 meses, posteriormente se estabilizan (60 – 10 meses), de tal forma que a los 180,77 meses sobreviven el 52,6% de

los pacientes con tipo histológico intestinal convencional, y han fallecido todos los pacientes con tipo histológico mucinoso (fig.8).

Figura 8. Supervivencia específica según el tipo histológico



Al estudiar la supervivencia de los casos con tipo histológico intestinal correlacionado con el patrón de β -catenina, apreciamos como las estimaciones de media son menores en los subgrupos que muestran negatividad para β -catenina, siendo esta mucho menor en aquellos con tipo histológico mucinoso en comparación con el intestinal (26,920 y 85,434 meses, respectivamente) (tabla 29).

Tabla 29. Media y mediana de la supervivencia en función del tipo histológico correlacionada con la β -catenina

| Tipo histológico | Beta-catenina | Media | | | |
|------------------|--------------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| INTestinal | Negativo | 85,434 | 17,053 | 52,010 | 118,858 |
| | Positivo MC y C | 116,856 | 15,912 | 85,669 | 148,043 |
| | Positivo C, MC y N | 125,223 | 10,746 | 104,160 | 146,286 |
| | Global | 127,484 | 9,199 | 109,455 | 145,513 |

| | | | | | |
|-----------------|---------------------------|---------|--------|---------|---------|
| MUCINOSO | Negativo | 26,920 | 12,509 | 2,403 | 51,437 |
| | Positivo MC y C | 133,943 | 26,314 | 82,368 | 185,518 |
| | Positivo C, MC y N | 103,077 | 25,184 | 53,717 | 152,437 |
| | Global | 109,765 | 16,802 | 76,833 | 142,696 |
| Global | Global | 124,758 | 8,224 | 108,639 | 140,876 |

MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

Las curvas de supervivencia nos muestran como, en los tumores del tipo histológico intestinal, cae la supervivencia de forma abrupta y paralela en los casos que muestran inmunexpresión de β -catenina en el citoplasma y/o membrana aumentada y en el núcleo (desde 0 a 60 meses). Posteriormente, ambas se estabilizan, siendo la supervivencia sensiblemente menor en los pacientes que muestran tinción nuclear de β -catenina (a los 108,90 meses sobreviven el 52% de los pacientes) en comparación con los que únicamente muestran aumento de tinción de membrana y/o citoplasmática (que sobreviven el 58% de los pacientes) (figura 9A).

A pesar de la escasez de casos, aquellos con tipo histológico mucinoso muestran un patrón de curvas de supervivencia similar (fig. 9B).

Figura 9A. Supervivencia específica según el tipo histológico intestinal correlacionado con la β -catenina

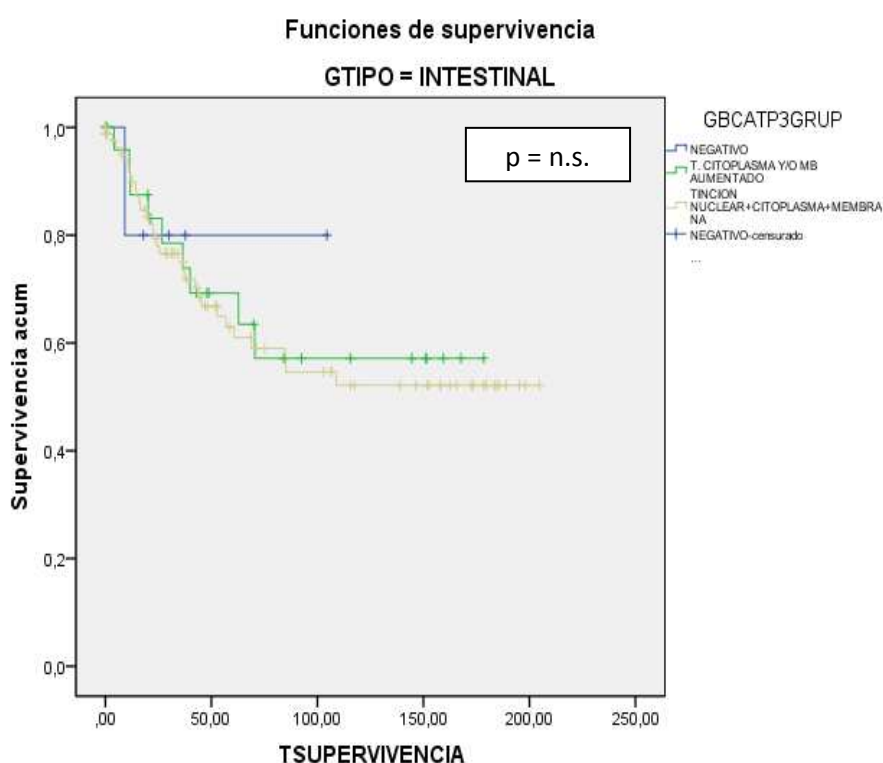
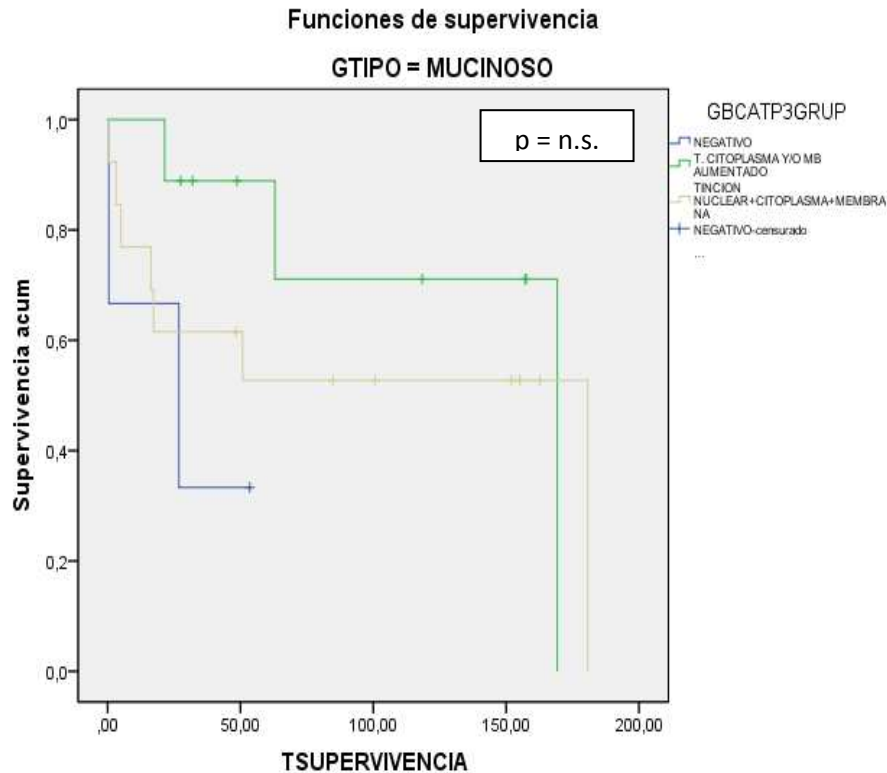


Figura 9B. Supervivencia específica según el tipo histológico mucinoso correlacionado con la β -catenina



- **Tipo de mucina.** Al analizar la supervivencia de la variable mucina (ausencia, presencia y el subtipo) se aprecia que la estimación de la media perteneciente al subtipo de mucina “fixed” es la menor de todas; 73,070 meses, con una mediana de 26,830. Mientras que las medias estimadas del subtipo mucinoso “floating” y de la ausencia de mucina son parecidas entre sí (133,429 y 109,731 meses, respectivamente) (tabla 30).

Tabla 30. Media y mediana de la supervivencia en función del tipo de mucina

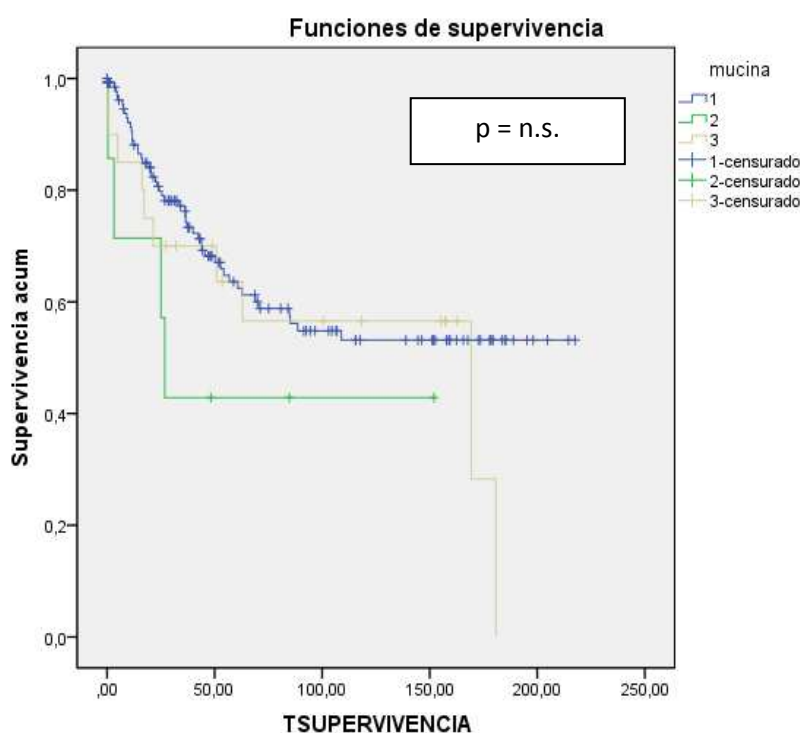
| mucina | Media | | | | Mediana | |
|------------|------------|--------------|-------------------------------|---------|------------|--------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | | Estimación | Error típico |
| | | | Límite | Límite | | |
| Ausencia | 133,429 | 9,089 | 115,614 | 151,244 | . | . |
| “fixed” | 73,070 | 26,067 | 21,979 | 124,161 | 26,830 | 2,357 |
| “floating” | 109,731 | 18,875 | 72,736 | 146,727 | 169,270 | 78,462 |
| Global | 128,849 | 8,275 | 112,630 | 145,069 | 180,770 | . |

| mucina | Mediana | |
|--------|-------------------------------|-----------------|
| | Intervalo de confianza al 95% | |
| | Límite inferior | Límite superior |

| | | |
|-------------------|--------|---------|
| Ausencia | . | . |
| “fixed” | 22,211 | 31,449 |
| “floating” | 15,485 | 323,055 |
| Global | . | . |

Las gráficas de supervivencia muestran un trazado similar entre el subgrupo que no presenta mucina y el subgrupo con mucina de tipo “floating”. Aunque, tras el descenso inicial, el subgrupo con ausencia de mucina se estabiliza, sobreviviendo a los 180,7 meses el 53,2% de los pacientes, mientras que han fallecido todos los pacientes con subtipo mucinoso “floating”. Por otra parte, los escasos pacientes que presentan el subtipo mucinoso “fixed” muestran un descenso de supervivencia inicial mucho más abrupto, estabilizándose posteriormente en el 42’9% (fig. 10).

Figura 10. Supervivencia específica según el tipo de mucina



Al estudiar la supervivencia de la presencia o no de mucina correlacionada con el patrón de inmunotinción de β -catenina, se aprecia que la estimación de la media menor corresponde al subgrupo que presenta mucina y es negativo para β -catenina (26,920 meses), mientras que la estimación de media más alta corresponde al subgrupo con presencia de mucina y β -catenina positiva en el citoplasma y/o membrana aumentada (133,943 meses) (tabla 31).

Tabla 31. Media de la supervivencia en función del tipo de mucina correlacionada con la β -catenina

| MUCINA | β -catenina en el compartimento profundo | Media | | | |
|-----------|--|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Ausencia | Negativo | 85,434 | 17,053 | 52,010 | 118,858 |
| | Positivo MC y C | 116,856 | 15,912 | 85,669 | 148,043 |
| | Positivo C, MC y N | 125,223 | 10,746 | 104,180 | 146,302 |
| | Global | 127,484 | 9,199 | 109,455 | 145,513 |
| Presencia | Negativo | 26,920 | 12,509 | 2,403 | 51,437 |
| | Positivo MC y C | 133,943 | 26,314 | 82,368 | 185,518 |
| | Positivo C, MC y N | 103,077 | 25,184 | 53,717 | 152,437 |
| | Global | 109,765 | 16,802 | 76,833 | 142,696 |
| Global | Global | 124,758 | 8,224 | 108,639 | 140,876 |

MC: membrana citoplasmática; C: citoplasma; N: núcleo

Las curvas de supervivencia muestran una clara similitud y peor supervivencia en aquellos pacientes con tumores que no tengan mucina y muestren un patrón de inmunotinción citoplasmático y/o de membrana aumentado ó tinción nuclear, si bien el pronóstico de supervivencia es sensiblemente peor en aquellos tumores que muestren traslocación nuclear de la β -catenina, ya que a los 108'9 meses tan sólo sobreviven el 52% de los pacientes (fig. 11A).

A pesar de la escasez de pacientes con presencia de mucina, todos los pacientes de los dos grupos con inmunoexpresión de β -catenina fallecieron a los 169'2 y 180'7 meses, respectivamente. Además, se conserva la tendencia de peor pronóstico en aquellos pacientes que muestren inmunoexpresión nuclear de β -catenina. Si bien es cierto que el subgrupo con negatividad de β -catenina muestra una caída inicial de la supervivencia, posteriormente se estabiliza, sobreviviendo a los 180,7 meses el 33,3% de los pacientes (fig. 11B).

Figura 11A. Supervivencia específica según la ausencia de mucina correlacionada con la β -catenina

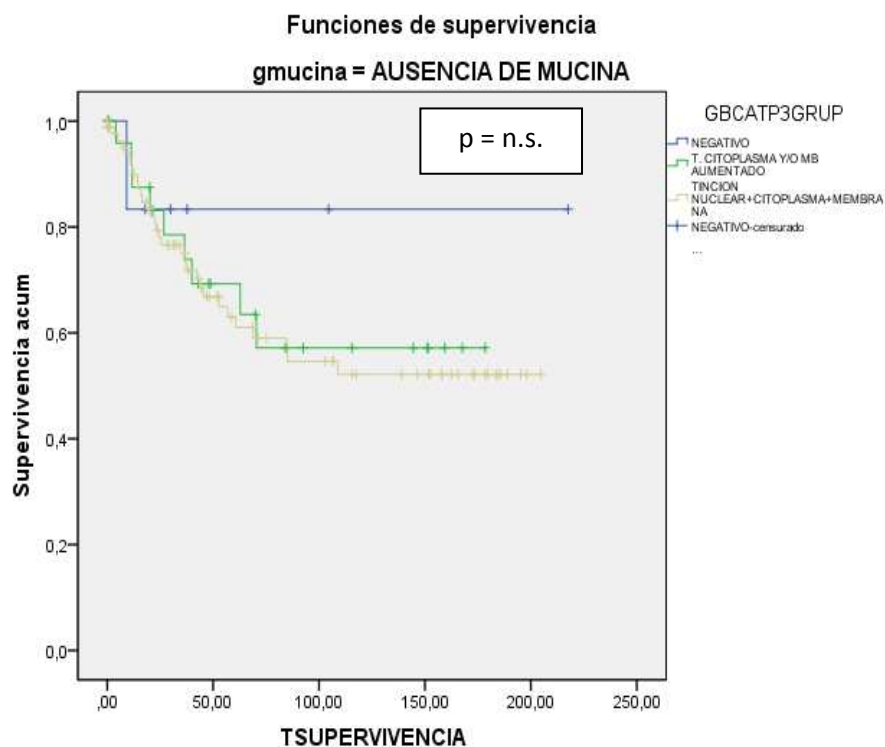
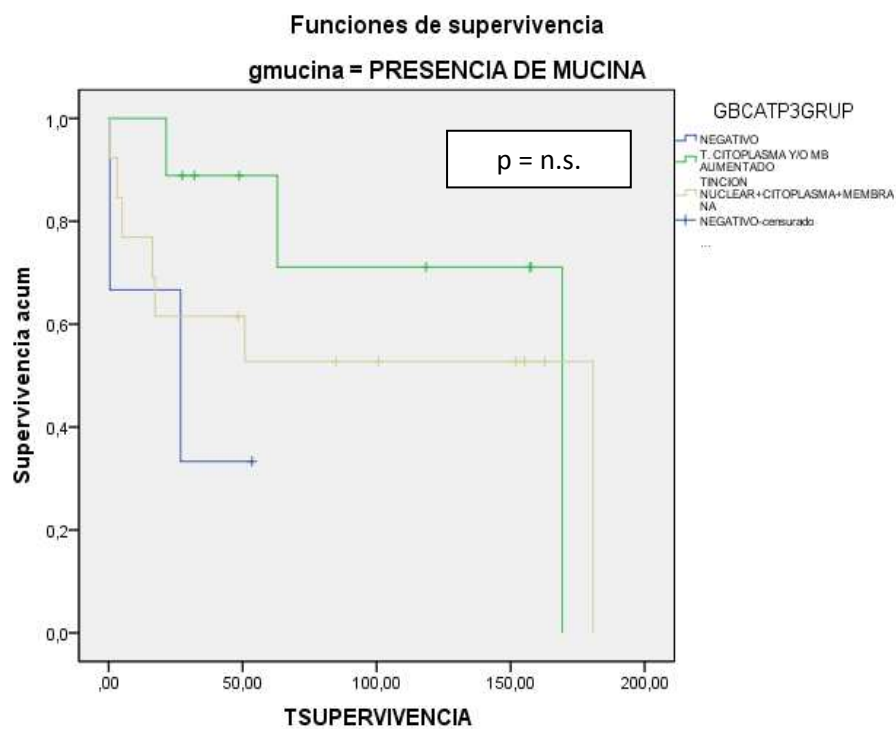


Figura 11B. Supervivencia específica según la presencia de mucina correlacionada con la β -catenina



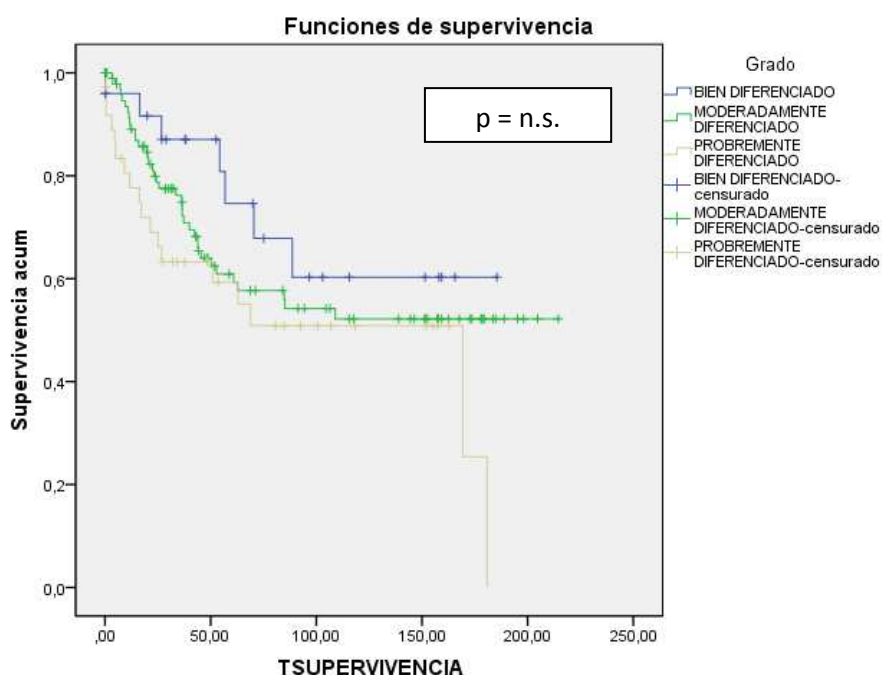
- **Grado histológico.** La estimación de la media de supervivencia desciende conforme más indiferenciado se ha hecho el tumor. De tal forma que en el subgrupo tumoral con grado pobremente diferenciado, la estimación de la media ha sido de 100,642 meses, mientras que en el subgrupo bien diferenciado ha sido de 132,149 meses (tabla 32).

Las correspondientes curvas de supervivencia muestran trazados similares, aunque existe mayor similitud y peor supervivencia entre los grados moderadamente y pobremente diferenciados, de tal forma que el descenso inicial de la supervivencia es más acusado en estos dos en comparación con el grado bien diferenciado. A los 180,7 meses, la supervivencia del grado bien diferenciado se ha estabilizado, habiendo sobrevivido el 60% de los pacientes, mientras que solo sobreviven el 52% de los pacientes con grado moderado y no ha sobrevivido ninguno de los pobremente diferenciados (figura 12).

Tabla 32.- Media de la supervivencia en función del grado histológico

| Grado | Media | | | |
|----------------------------|------------|--------------|-------------------------------|---------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite |
| Bien diferenciado | 132,149 | 16,156 | 100,483 | 163,815 |
| Moderadamente diferenciado | 129,328 | 10,452 | 108,843 | 149,813 |
| Pobremente diferenciado | 100,642 | 14,221 | 72,768 | 128,516 |
| Global | 126,941 | 8,206 | 110,857 | 143,025 |

Figura 12. Supervivencia específica según el grado histológico



Al intentar correlacionar las curvas de supervivencia del grado histológico con el patrón de inmunexpresión de β -catenina (de forma independiente); observamos que en el subgrupo bien diferenciado existen muy pocos casos y ni siquiera hay tinción negativa de β -catenina, por lo que la distribución gráfica no es significativa (fig.13A).

En el conjunto moderadamente diferenciado es donde mayor agrupación de casos hay y, por lo tanto, se puede apreciar una clara separación en cuanto al pronóstico entre los pacientes que muestran negatividad para β -catenina (donde sobreviven el 100%) y los que tienen algún tipo de inmunexpresión para la misma. Además, se observa como la curva de supervivencia en los casos con traslocación nuclear de β -catenina tiene un descenso mucho más abrupto en los 50 primeros meses, para terminar estabilizándose a los 108 meses, habiendo sobrevivido el 48,5% de los pacientes. Mientras que sobreviven el 63,5% de los pacientes con tinción de membrana aumentada y/o citoplasma (fig. 13B).

Figura 13A. Supervivencia específica según el grado bien diferenciado correlacionado con la β -catenina

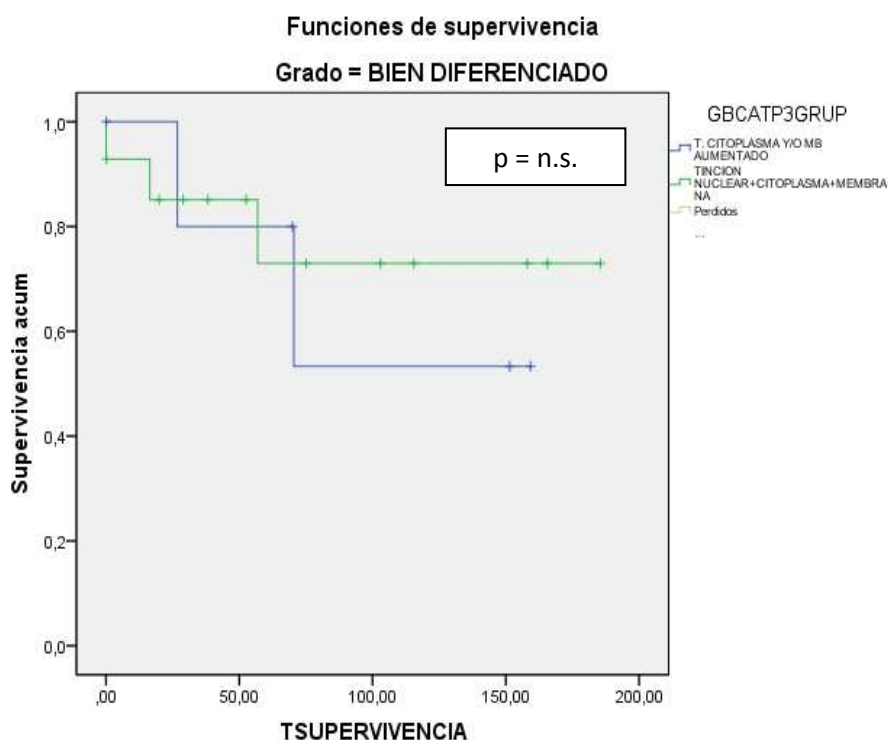
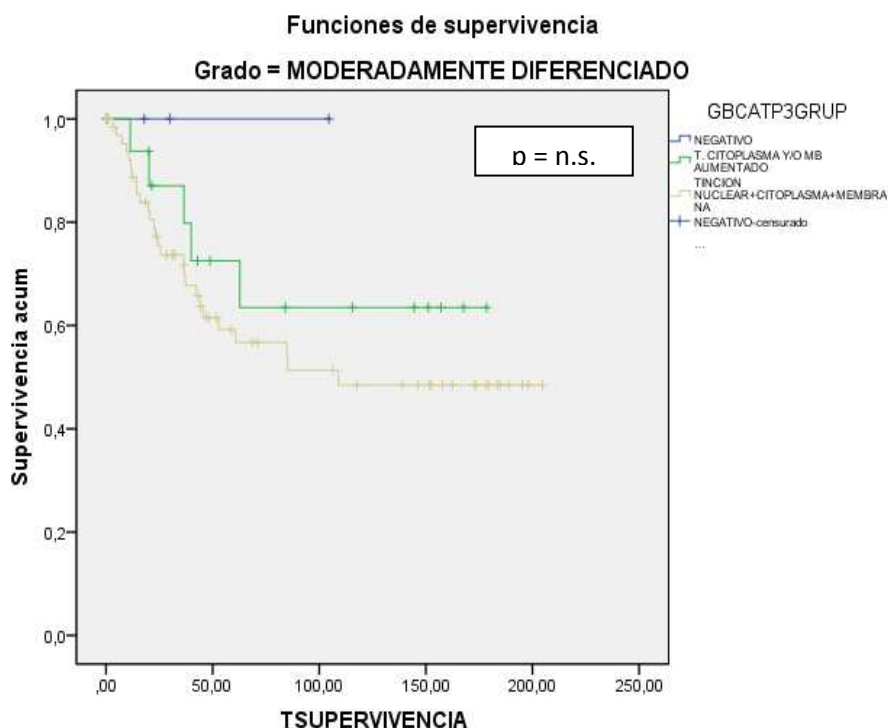
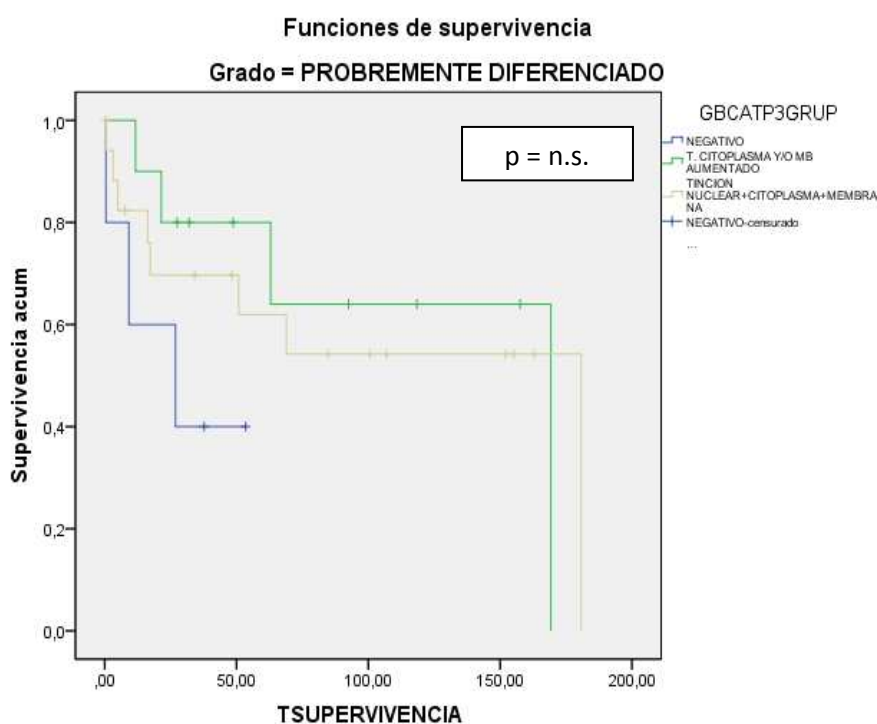


Figura 13B. Supervivencia específica según el grado moderadamente diferenciado correlacionado con la β -catenina



Por último, en los pacientes con grado histológico pobremente diferenciado se aprecia cierto paralelismo en las curvas de los subgrupos con positividad para β -catenina, pero mostrando peor pronóstico en aquellos que tienen traslocación nuclear, falleciendo en su totalidad entre los 170 y 180 meses. Mientras que de los que mostraron negatividad para β -catenina sobrevivieron el 40% (fig. 13C).

Figura 13C. Supervivencia específica según el grado pobremente diferenciado correlacionado con la β -catenina



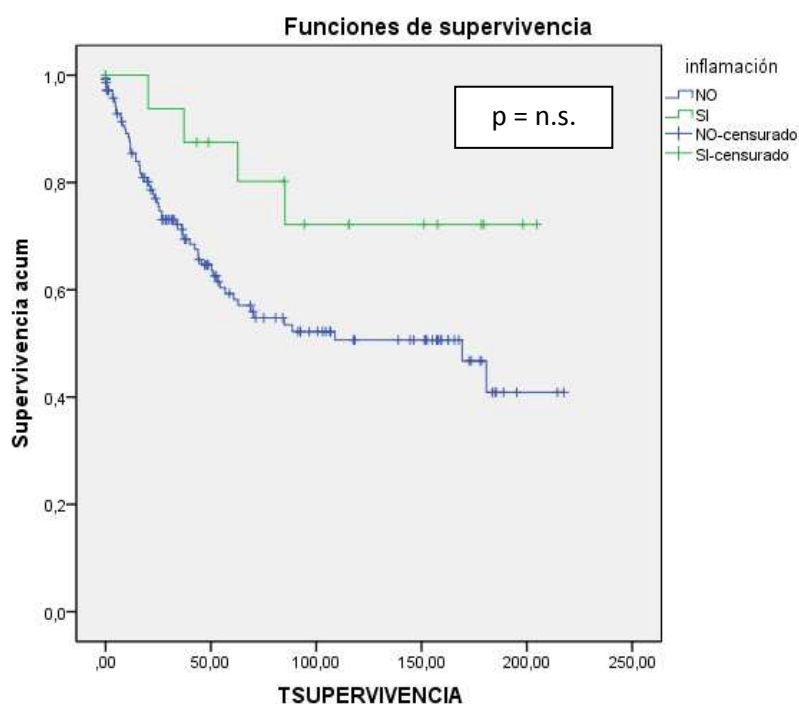
- **Inflamación crónica peritumoral.** La media de supervivencia fue superior (162,820 meses) a la mostrada por la ausencia de inflamación crónica (122,746 meses) (tabla 33).

Tabla 33. Media y mediana de la supervivencia en función de la inflamación crónica

| inflamación | Media | | | | Mediana | |
|------------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|------------|--------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | | Estimación | Error típico |
| | | | Límite | Límite superior | | |
| Ausencia | 122,746 | 8,904 | 105,294 | 140,199 | 169,270 | 44,034 |
| Presencia | 162,820 | 18,064 | 127,415 | 198,226 | . | . |
| Global | 128,515 | 8,289 | 112,269 | 144,761 | 169,270 | 48,113 |

Las curvas de supervivencia demuestran que los casos con ausencia de inflamación crónica peritumoral tienen peor supervivencia que aquellos con presencia de inflamación. A los 180,77 meses sobreviven el 72% de los pacientes con presencia de inflamación crónica, y sobreviven el 40,9% de los pacientes con ausencia de inflamación crónica (fig.14).

Figura 14. Supervivencia específica según la inflamación crónica



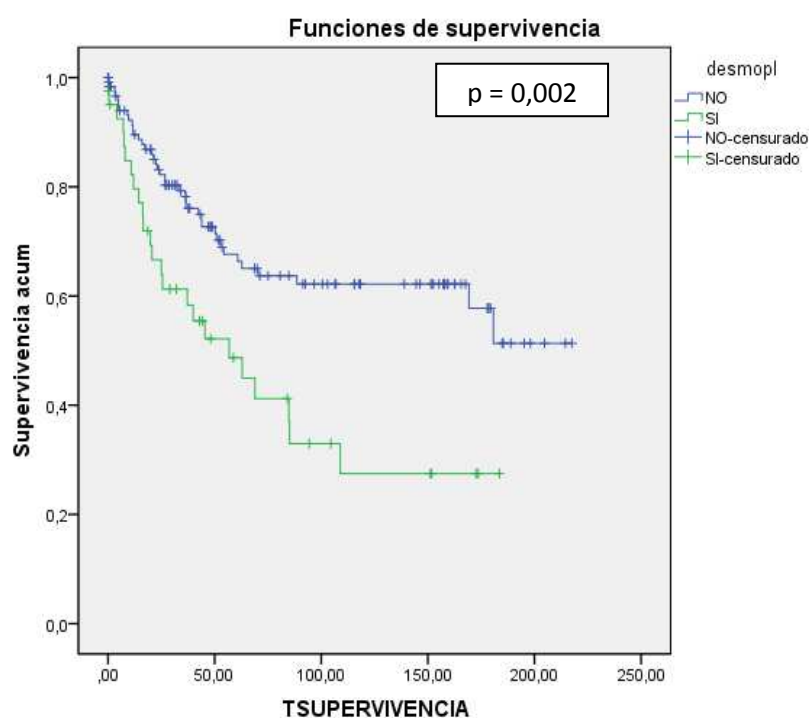
- **Desmoplasia.** La presencia de la misma, ha mostrado una estimación de la media de supervivencia inferior (79,002 meses) a la mostrada por la ausencia de desmoplasia (142,960 meses) (tabla 34).

Al considerar las curvas de supervivencia, si bien se observa un brusco descenso en los primeros meses (de 0 a 60 m.), posteriormente la supervivencia del subgrupo con ausencia de desmoplasia se estabiliza mientras que la tasa de supervivencia en los pacientes con presencia de desmoplasia sigue disminuyendo a los 180,77 meses sobreviven el 51,3% de los pacientes que presentaron ausencia de desmoplasia, y solo sobreviven el 27% de los casos con presencia de desmoplasia (fig. 15).

Tabla 34. Media y mediana de supervivencia en función de la desmoplasia

| Desmoplasia | Media | | | | Mediana | |
|-------------|------------|--------------|-------------------------------|---------|------------|--------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | | Estimación | Error típico |
| | | | Límite | Límite | | |
| Ausencia | 142,960 | 9,405 | 124,527 | 161,394 | . | . |
| Presencia | 79,002 | 12,396 | 54,707 | 103,297 | 56,870 | 18,460 |
| Global | 128,849 | 8,275 | 112,630 | 145,069 | 180,770 | . |

Figura 15. Supervivencia específica según la desmoplasia



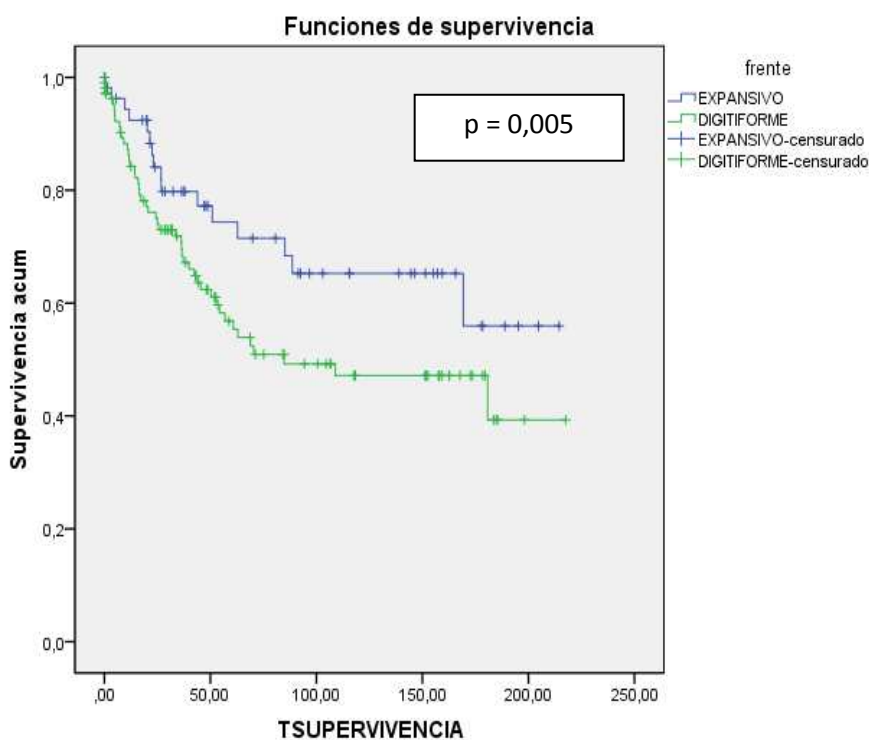
- **Frente infiltrante.** Cuando el frente de infiltración fue expansivo, la estimación de media de supervivencia fue superior a la demostrada por el frente digitiforme (149,033 y 117,590 meses, respectivamente) (tabla 35).

Las curvas de supervivencia muestran una caída inicial similar en ambos frentes (0 – 30 meses), posteriormente se empieza a estabilizar progresivamente la curva del frente expansivo mientras que la supervivencia del frente digitiforme aún sigue disminuyendo (30 – 80 meses). Entre los 80 y 170 meses, ambas curvas se encuentran estabilizadas, de tal forma que a los 180,77 meses sobreviven el 56% de los tumores con frente expansivo, y el 39,3% de los que tenían frente digitiforme (fig.16).

Tabla 35. Media y mediana de la supervivencia en función del frente infiltrante

| Frente | Media | | | |
|-------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| EXPANSIVO | 149,033 | 13,195 | 123,171 | 174,895 |
| DIGITIFORME | 117,590 | 10,248 | 97,503 | 137,677 |
| Global | 128,849 | 8,275 | 112,630 | 145,069 |

Figura 16. Supervivencia específica según el tipo de infiltración



Al correlacionar el patrón de inmunoexpresión de β -catenina con el tipo de frente, hemos observado que la estimación de la media en el subgrupo con β -catenina negativo y frente expansivo es la menor de todas (24,318 meses, con una mediana de 26,830 meses), mientras que las estimaciones de medias del resto de subgrupos superan los 100 meses. Al estudiar las diferencias intragrupos, se aprecia como las estimaciones de media se invierten, ya que en el subgrupo de β -catenina positivo, los pacientes cuyos tumores muestran un frente expansivo presentan una estimación de la media de 143,029 meses (tabla 36).

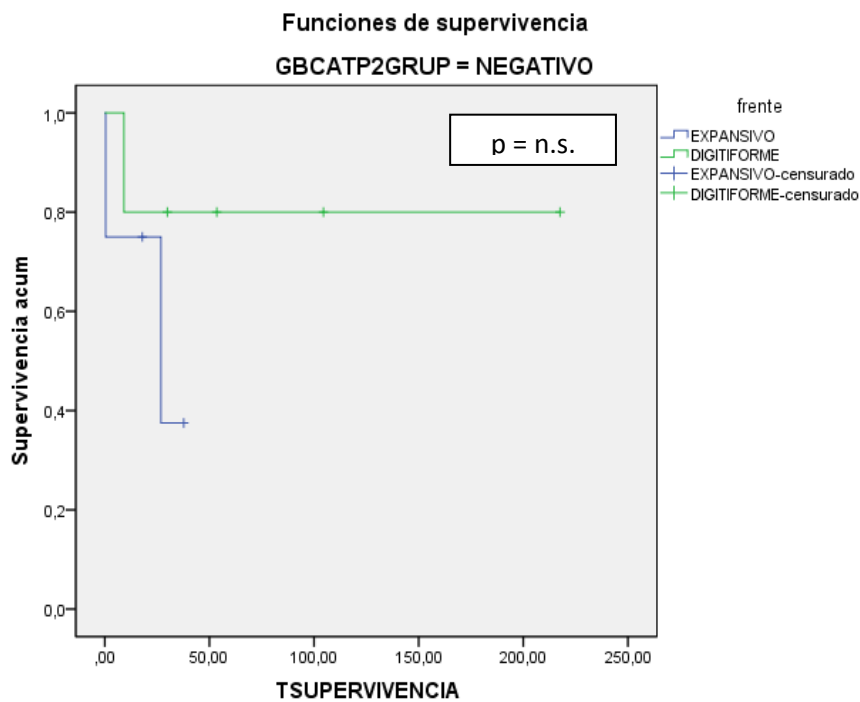
Tabla 36. Media y mediana de la supervivencia en función de la β -catenina relacionada con el frente infiltrante

| GBCATP2GRUP frente | | Media | | | |
|-----------------------|-------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| NEGATIVO | EXPANSIVO | 24,318 | 7,477 | 9,663 | 38,972 |
| | DIGITIFORME | 175,890 | 37,280 | 102,822 | 248,958 |
| | Global | 145,562 | 33,748 | 79,416 | 211,709 |
| POSITIVO | EXPANSIVO | 143,029 | 14,360 | 114,883 | 171,175 |
| | DIGITIFORME | 114,880 | 9,742 | 95,785 | 133,975 |
| | Global | 125,509 | 8,385 | 109,073 | 141,944 |
| Global | Global | 131,584 | 8,858 | 114,223 | 148,946 |

| GBCATP2GRUP frente | | Mediana | | | |
|-----------------------|-------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| NEGATIVO | EXPANSIVO | 26,830 | 20,163 | ,000 | 66,350 |
| | DIGITIFORME | . | . | . | . |
| | Global | . | . | . | . |
| POSITIVO | EXPANSIVO | . | . | . | . |
| | DIGITIFORME | 108,900 | 43,307 | 24,018 | 193,782 |
| | Global | 180,770 | 64,498 | 54,354 | 307,186 |
| Global | Global | 180,770 | . | . | . |

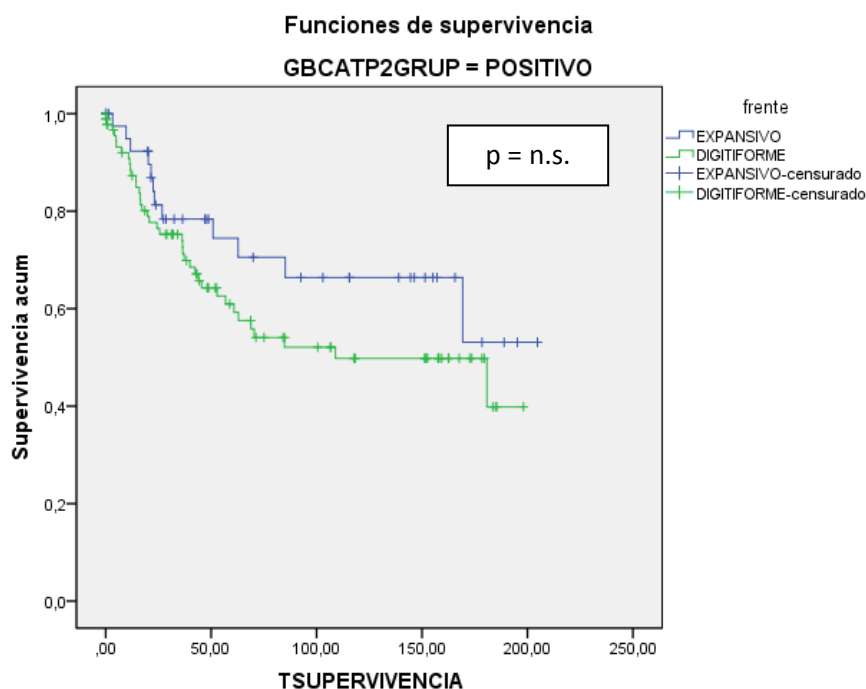
En las curvas de supervivencia se aprecia como en los pacientes con inmunoexpresión de β -catenina negativa, la curva del subgrupo con frente digitiforme se estabiliza a los 10 meses, mientras que la curva del frente expansivo disminuye de forma brusca. No obstante, este subgrupo consta de escasos pacientes como para poder generalizar estos hallazgos (figura 17A).

Figura 17A. Supervivencia específica según la β -catenina relacionada con el frente expansivo



Sin embargo, los pacientes con inmunoexpresión de β -catenina positiva muestran curvas de ambos subgrupos (frente expansivo y digitiforme) de trazado similar, aunque la curva del subgrupo digitiforme cae de forma abrupta hasta los 70,4 meses, antes de empezar a estabilizarse. A los 200 meses sobreviven el 53,1% de los pacientes con β -catenina positivo y frente expansivo, mientras que solo sobreviven el 39,8% de los pacientes con frente digitiforme (fig. 17B).

Figura 17B. Supervivencia específica según la β -catenina relacionada con el frente infiltrante



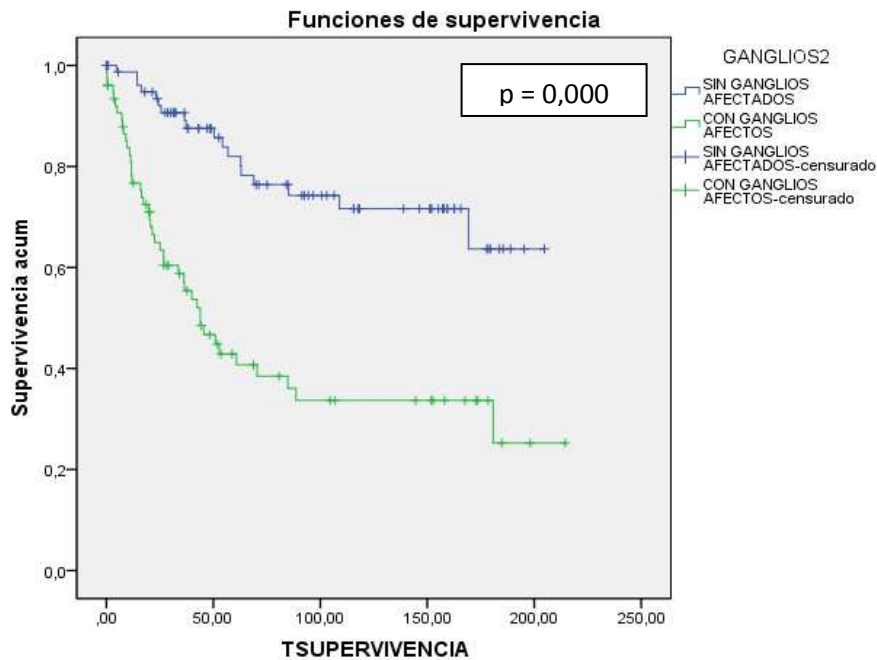
- **Afectación ganglionar.** Los pacientes con ganglios afectados tienen una estimación de media de supervivencia menor que aquellos con ganglios negativos (89,024 y 157,931 meses, respectivamente) (tabla 37).

Tabla 37. Media de la supervivencia en función de la afectación ganglionar

| Afectación ganglionar | Media | | | |
|-----------------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Presencia | 157,931 | 9,369 | 139,568 | 176,295 |
| Ausencia | 89,024 | 11,366 | 66,747 | 111,301 |
| Global | 127,758 | 8,219 | 111,650 | 143,866 |

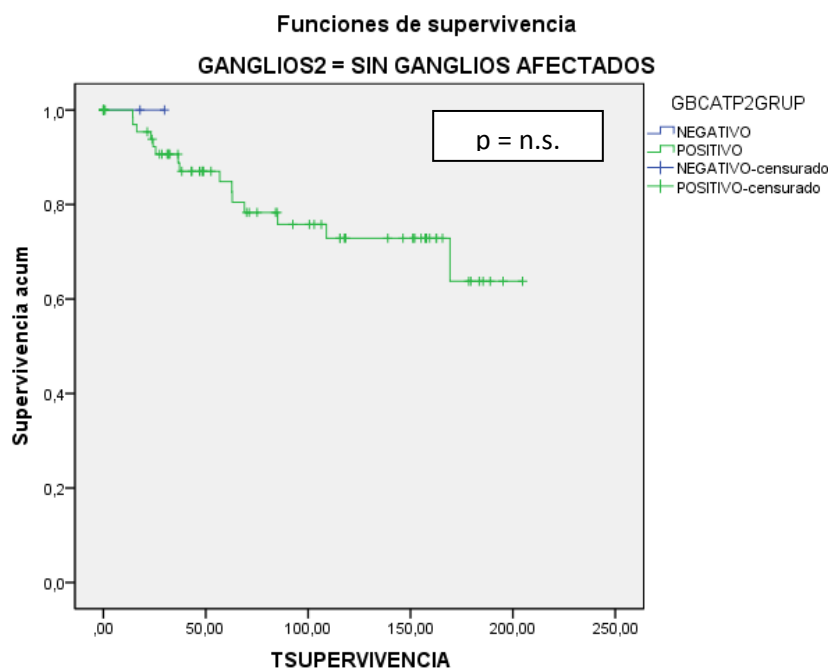
Las curvas de supervivencia muestran trazados muy distantes; de tal forma que la supervivencia de los pacientes con afectación ganglionar cae de forma brusca en los primeros 80 meses, mientras que la disminución de la supervivencia de los pacientes que no muestran ganglios afectados es más atenuada, así a los 180,77 meses sobreviven el 63,7% de los pacientes sin afectación ganglionar, y tan solo el 25,2% de los pacientes con afectación (figura 18).

Figura 18. Supervivencia específica según la afectación ganglionar



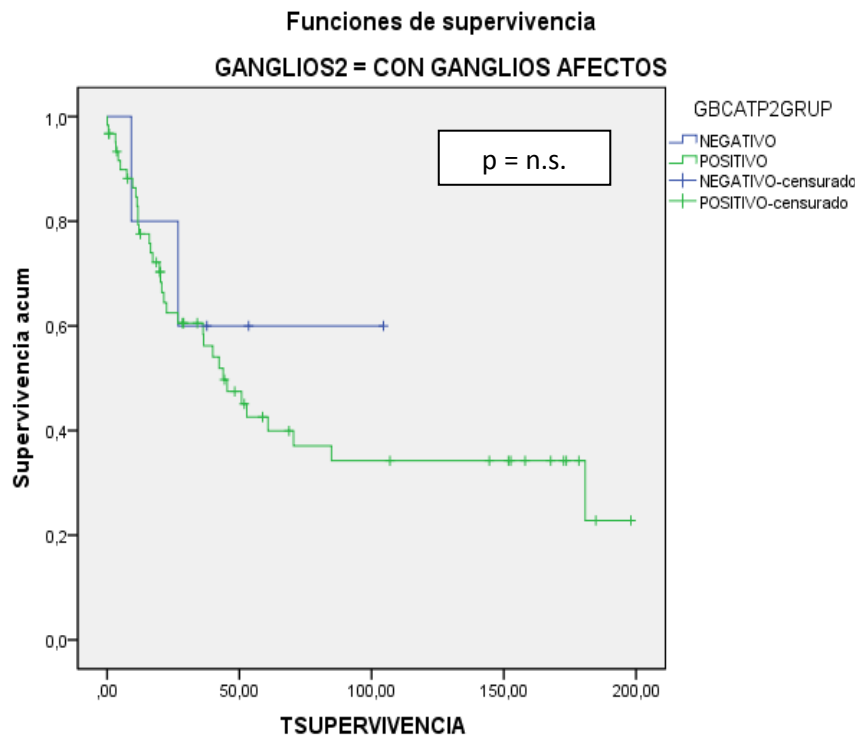
Al estudiar la correlación de la supervivencia en pacientes con presencia/ausencia de ganglios afectados y el patrón de inmunoexpresión de β -catenina (valorada en ausencia o presencia); observamos que en el subgrupo sin afectación ganglionar, la práctica totalidad de los casos mostraron algún tipo de positividad para la β -catenina, y a los 169,27 meses sobreviven el 63'8 % de los pacientes (fig.19A).

Figura 19A. Supervivencia específica según la β -catenina correlacionada con la ausencia de afectación ganglionar



Mientras que en el subgrupo con afectación ganglionar, la disminución de la supervivencia es más acusada en los casos con β -catenina positiva: a los 180,77 meses, sobreviven el 60% de los pacientes con ausencia de inmunotinción para β -catenina, mientras que sólo el 22,8 % de los pacientes con β -catenina positiva (fig. 19B).

Figura 19B. Supervivencia específica según la β -catenina correlacionada con la presencia de afectación ganglionar



- **Extensión loco-regional.** Se observa una disminución de la estimación de la media de supervivencia conforme más extendido está el tumor. De tal forma que, en el subgrupo con extensión loco-regional diseminada: la estimación de la media ha sido de 38,230 meses (con una mediana de 14,330), y en el subgrupo con extensión localizada ha sido de 158,6 meses (tabla 38).

Las curvas de supervivencia muestran una caída inicial en los primeros 90 meses, de mayor gravedad conforme más extendida está la enfermedad ($p=0,000$). Posteriormente se estabilizan, de tal forma que a los 200 meses sobreviven el 61,8% de los pacientes con extensión localizada; el 31,6% de los pacientes con extensión regional y tan sólo sobreviven el 9% de los pacientes con enfermedad diseminada (fig. 20).

Sin embargo al intentar correlacionar estos hallazgos con el patrón de inmunotinción de β -catenina no hemos obtenido resultados significativos ni curvas de supervivencia relevantes.

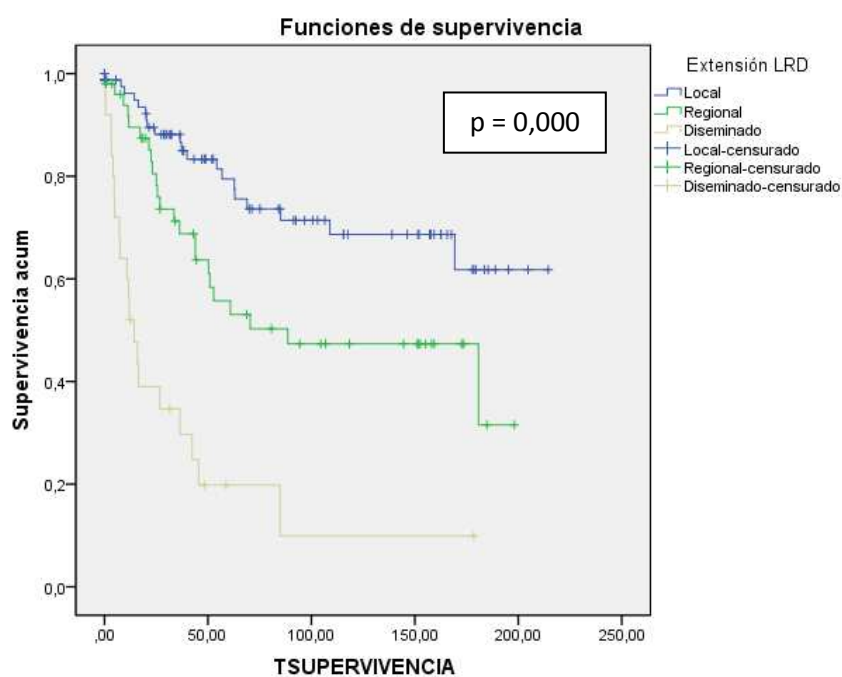
Tabla 38. Media y mediana de la supervivencia en función de la extensión loco-regional

| Extensión LRD | Media | | | |
|---------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Local | 158,600 | 10,438 | 138,141 | 179,059 |
| Regional | 109,717 | 12,652 | 84,918 | 134,515 |
| Diseminado | 38,230 | 12,012 | 14,686 | 61,774 |
| Global | 125,441 | 8,220 | 109,329 | 141,553 |

| Extensión LRD | Mediana | | | |
|---------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Local | . | . | . | . |
| Regional | 88,600 | 42,030 | 6,221 | 170,979 |
| Diseminado | 14,330 | 3,390 | 7,686 | 20,974 |
| Global | 169,270 | 42,253 | 86,455 | 252,085 |

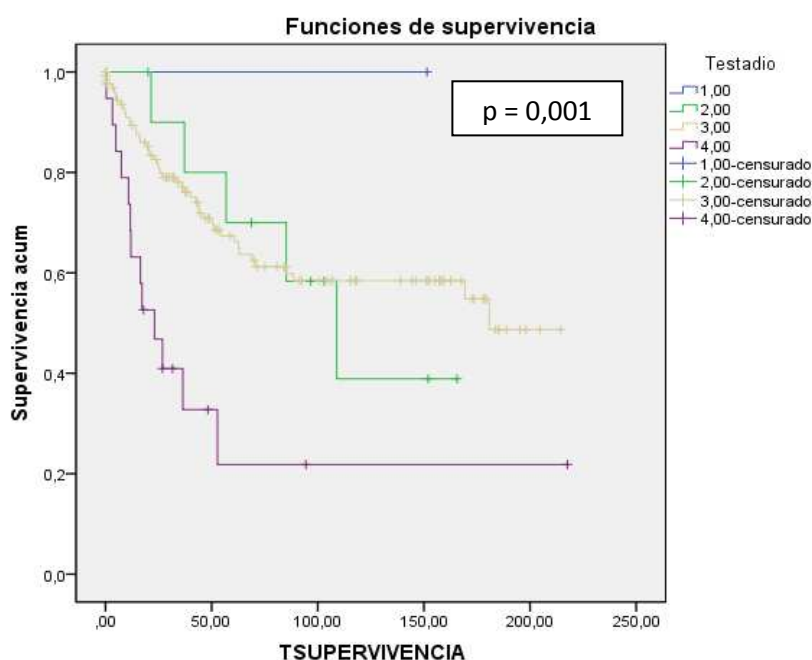
LRD: loco-regional diseminado

Figura 20. Supervivencia específica según la extensión loco-regional



- **Tamaño tumoral (T) correspondiente al TNM.** Los pacientes con tumores de tamaño T1 obtienen una representación gráfica plana ya que todos los pacientes sobreviven; los T2 y T3 muestran curvas similares, a los 216 meses sobreviven el 38% de los pacientes con tamaño tumoral T2 y el 48,7% de los T3; mientras que los pacientes con tamaño tumoral T4 son los que peor curva de supervivencia muestran, con una caída prácticamente vertical de la misma hasta los 50 meses y una estabilización posterior, de tal forma que sobreviven solo el 21% de los pacientes (fig. 21) . Estos resultados, si bien son estadísticamente significativos ($p = 0,001$), no hemos podido correlacionarlos con el patrón de inmunoexpresión de β -catenina.

Figura 21. Supervivencia específica según tamaño tumoral (T del TNM)



- **Metástasis (M) correspondiente al TNM.** Los pacientes con presencia de metástasis mostraron una estimación de la media de supervivencia menor que aquellos sin metástasis (44,331 y 141,152 meses, respectivamente) (tabla 39).

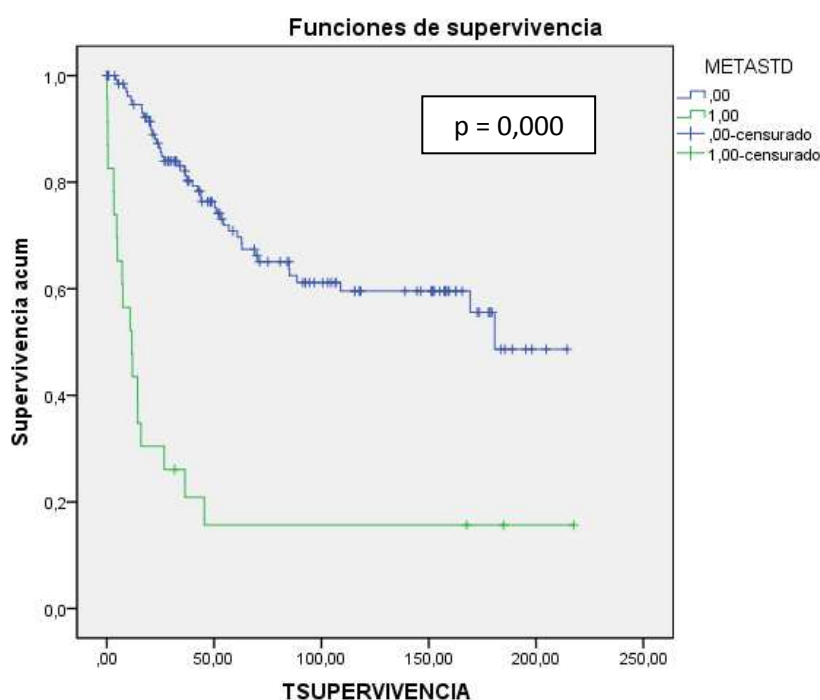
Al estudiar las curvas de supervivencia, obtenemos resultados estadísticamente significativos ($p = 0,000$), ya que la caída de la supervivencia es casi vertical en los primeros 50 meses para los pacientes que presentaron metástasis en el momento del diagnóstico, de tal forma que a los 216 meses tan sólo sobreviven el 15% de los pacientes. Mientras que la curva de supervivencia de los pacientes sin metástasis presentan un trazado de descenso más suave en los primeros 50 meses y una estabilización posterior, sobreviviendo el 48,6% de los pacientes (fig. 22).

Al intentar correlacionar estas curvas con el patrón de inmunotinción de β -catenina, no hemos obtenido resultados concluyentes.

Tabla 39. Media de la supervivencia en función de las metástasis (M del TNM)

| Metástasis (M del TNM) | Media | | | | Mediana | |
|---------------------------|------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | | Estimación | Error típico |
| | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Ausencia | 141,152 | 8,578 | 124,340 | 157,964 | 180,770 | . |
| Presencia | 44,331 | 16,282 | 12,419 | 76,244 | 11,700 | 3,649 |
| Global | 128,453 | 8,292 | 112,201 | 144,704 | 169,270 | 48,141 |

Figura 22. Supervivencia específica según las metástasis (M del TNM)



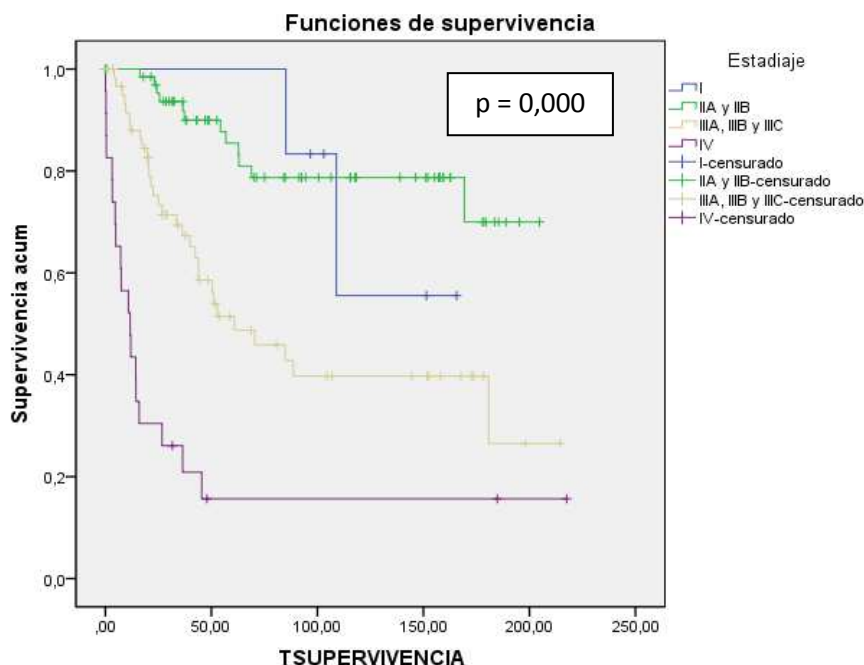
- **Estadio histopatológico.** Generalmente, ha demostrado una estimación de la media menor conforme aumentaba su valor. Es decir, pacientes en estadio IV tienen la estimación de media más baja (44,331 meses), seguidos de los estadios III (103,101 meses). No obstante, el estadio tipo II ha mostrado la mejor estimación de media (167,756 meses), incluso por encima de la estimación del tipo I (136,467 meses) (tabla 40).

Con respecto a las curvas de supervivencia, se aprecia una relación estadísticamente significativa ($p = 0,000$) entre el aumento del estadio y la disminución de la supervivencia. Así, las curvas muestran una caída más acusada en los primeros meses para los estadios III y IV, observándose como a los 216 meses tan sólo sobreviven el 15,5% de los pacientes en estadio IV; el 26,5% de los pacientes en estadio III, el 70% de los pacientes con estado II y, por último (aunque invirtiendo la tendencia), el 55% de los casos en estadio I (fig. 23).

Tabla 40. Media y mediana de la supervivencia en función del estadio

| Estadio | Media | | | | Mediana | |
|-------------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|------------|--------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | | Estimación | Error típico |
| | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| I | 136,462 | 15,914 | 105,271 | 167,652 | . | . |
| IIA y IIB | 167,756 | 9,409 | 149,314 | 186,197 | . | . |
| IIIA, IIIB y IIIC | 103,101 | 12,874 | 77,869 | 128,334 | 60,870 | 18,745 |
| IV | 44,331 | 16,282 | 12,419 | 76,244 | 11,700 | 3,649 |
| Global | 128,773 | 8,278 | 112,549 | 144,997 | 180,770 | . |

Figura 23. Supervivencia específica según el estadio



Al correlacionar de forma independiente cada subgrupo de estadio con la inmunoexpresión de β -catenina, no hemos obtenido resultados objetivos. No obstante, en el subgrupo de estadios III: los pacientes con traslocación nuclear de β -catenina solo sobreviven el 23% a los 180,7 meses, mientras que los tumores con tinción citoplasmática y/o de membrana aumentada mostraron una supervivencia del 31,2% de los pacientes.

- **La recidiva posterior al diagnóstico.** La presencia de recidiva mostró una estimación de la media inferior a la presentada por la ausencia de la misma (74,127 y 172,032 meses, respectivamente) (tabla 41).

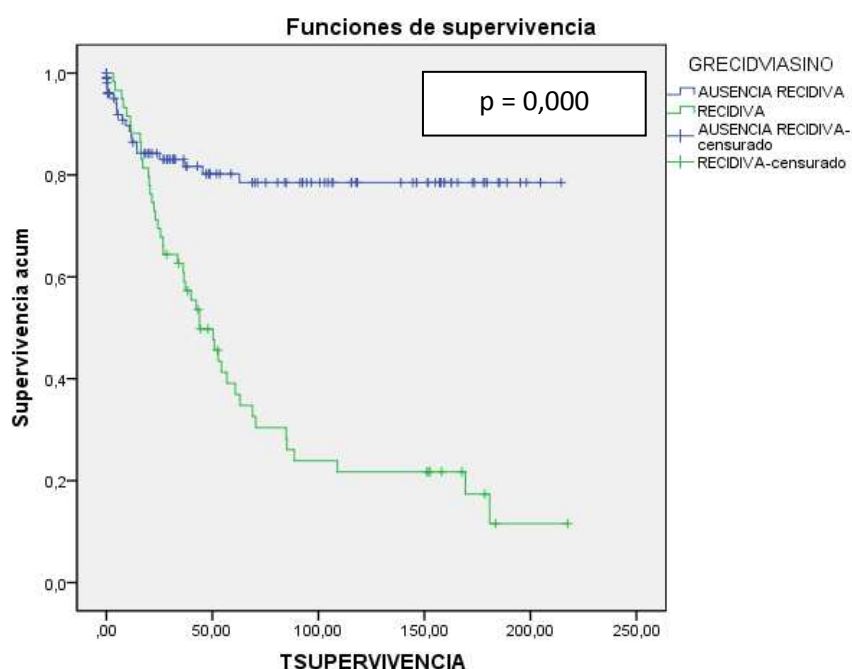
A su vez, las curvas de supervivencia de esta variable muestran resultados estadísticamente significativos ($p=0,000$); ya que la presencia de recidiva muestra una disminución aguda de la supervivencia en los primeros 80 meses, posteriormente se la curva se aplanan hasta llegar a los 216 meses donde sobreviven tan sólo el 11,7% de los pacientes. En contraste, el subgrupo de pacientes que no mostraron recidiva posterior al diagnóstico muestra una curva que se horizontaliza rápidamente, sobreviviendo el 78,5% de los pacientes (fig. 24).

Al estudiar las curvas de supervivencia de forma más específica para cada tipo de recidiva posterior al diagnóstico, también obtuvimos resultados significativos ($p=0,000$), pero sin grandes diferencias entre los distintos tipos de recidivas.

Tabla 41. Media y mediana de la supervivencia en función de la recidiva posterior al diagnóstico

| Recidiva posterior al diagnóstico | Media | | | |
|-----------------------------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Ausencia | 172,032 | 8,726 | 154,929 | 189,134 |
| Presencia | 74,127 | 9,868 | 54,786 | 93,468 |
| Global | 128,849 | 8,275 | 112,630 | 145,069 |

Figura 24. Supervivencia específica según la recidiva posterior al diagnóstico



3. Variables inmunohistoquímicas

- **Inmunoexpresión de p53 nuclear.** La estimación de la media de p53 positivo en el compartimento profundo fue ligeramente superior al subgrupo de casos con p53 negativo (136,610 y 105,642 meses, respectivamente) (tabla 42).

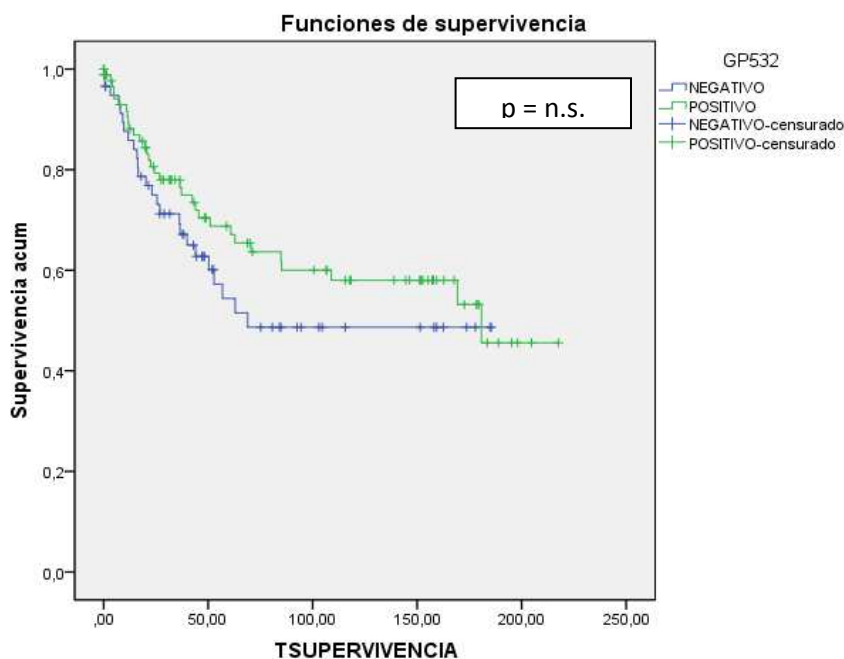
Los casos que fueron negativos para p53 mostraron una mayor disminución de la supervivencia (sobre todo en los primeros 60 meses). Posteriormente, ambas curvas se estabilizan, de tal forma que a los 180,7 meses sobreviven el 51,5% de los pacientes con negatividad para p53, mientras que sobreviven el 45,6% de los casos con tinción nuclear de p53 (fig. 25).

Tabla 42. Media y mediana de la supervivencia en función de la inmunoexpresión de p53 en el compartimento profundo

| P53 en compartimento tumoral profundo | Media | | | | Mediana | |
|---------------------------------------|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|------------|--------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | | Estimación | Error típico |
| | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Negativo | 105,642 | 11,589 | 82,927 | 128,357 | 68,900 | . |
| Positivo | 136,610 | 10,825 | 115,393 | 157,827 | 180,770 | . |
| Global | 129,617 | 8,658 | 112,648 | 146,587 | 180,770 | . |

c: compartimento

Figura 25. Supervivencia específica según la inmunoexpresión de p53 en el compartimento profundo.



- **Inmunoexpresión de β -catenina/p53.** Al correlacionar el patrón de inmunoexpresión de β -catenina con el de p53 (valorados en presencia o ausencia de inmunotinción, en el compartimento profundo), obtenemos curvas de supervivencia distintas. En el grupo de pacientes que fueron negativos para p53: los que también fueron β -catenina negativos mostraron una supervivencia inferior (a los 100 meses sobrevivieron el 44% de los pacientes) (fig. 26A).

Mientras que en el grupo de pacientes con presencia de p53 nuclear: los que mostraron positividad para β -catenina presentaron una curva de supervivencia peor, de tal forma que a los 216 meses sobreviven el 47% de los pacientes (fig. 26B).

Al estudiar esta misma correlación, teniendo en cuenta la valoración de β -catenina en los tres subgrupos habituales, observamos que se respeta el patrón de curvas de supervivencia. De tal forma que, en el grupo p53 negativo: la positividad de β -catenina de membrana aumentada y/o citoplasma, y nuclear muestra mejores supervivencias que los casos con β -catenina negativo (siendo la supervivencia ligeramente inferior si hay traslocación nuclear). Igualmente, en el subgrupo p53 positivo: se aprecia peor supervivencia en los casos con algún tipo de positividad para β -catenina, siendo esta objetivamente inferior cuando hay traslocación nuclear.

Figura 26A. Supervivencia específica según la inmunexpresión de β -catenina relacionada con p53 negativo en el compartimento profundo.

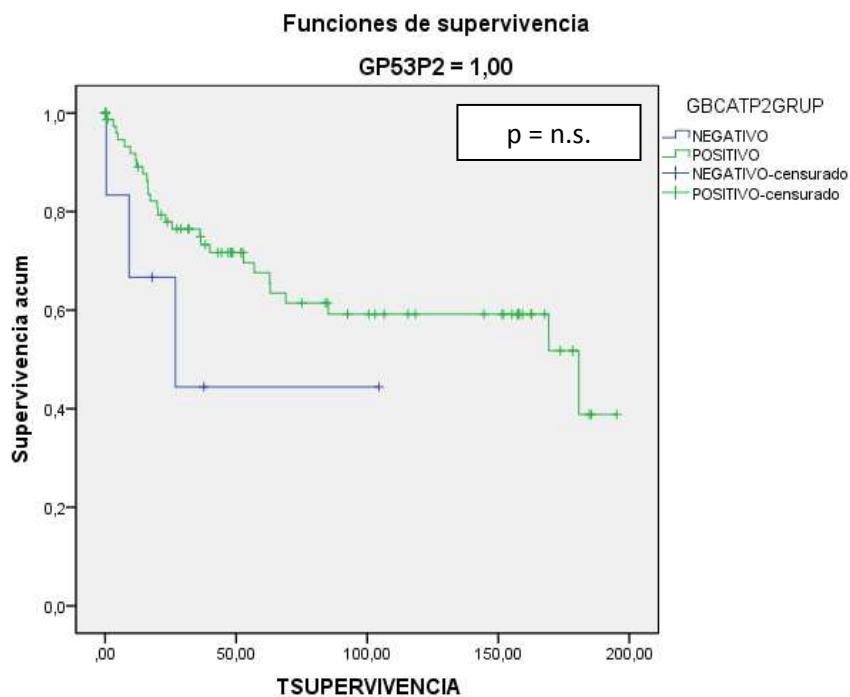
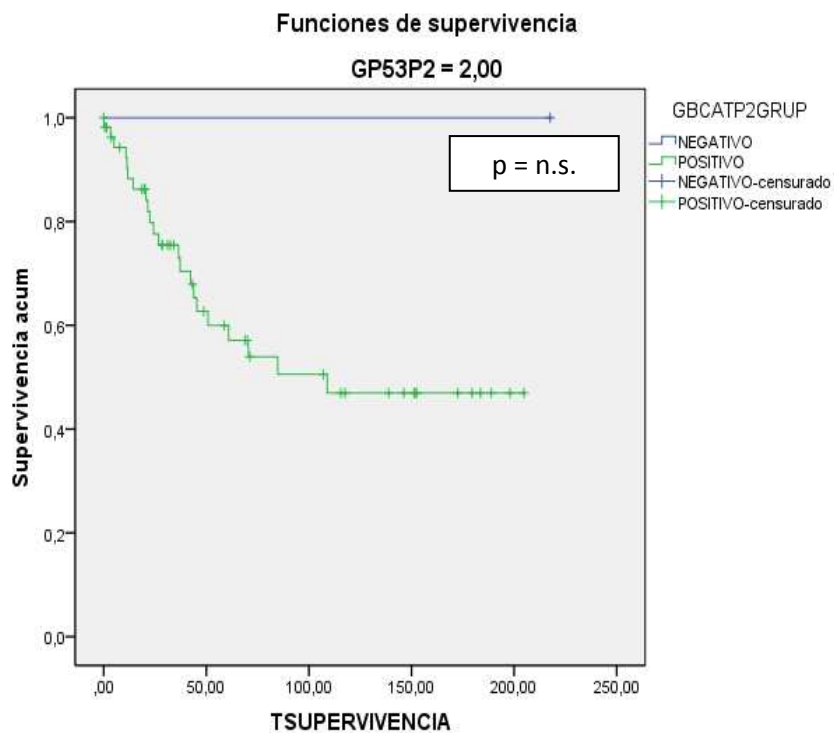


Figura 26B. Supervivencia específica según la inmunexpresión de β -catenina relacionada con p53 positivo en el compartimento profundo.



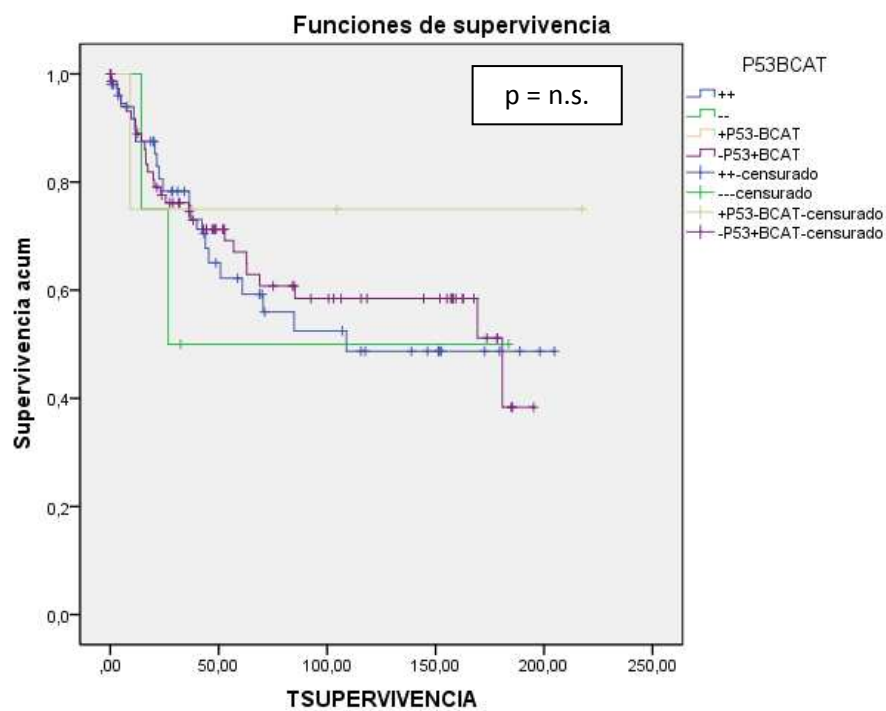
Si reagrupamos estos pacientes por subgrupos de inmunotinción; apreciamos que el subgrupo con doble negatividad para p53 y β -catenina es el que muestra una estimación de la media más baja (102,060 meses), mientras que la estimación más alta corresponde a aquellos pacientes cuyos tumores mostraron positividad para p53 nuclear y ausencia de inmunotinción para β -catenina (tabla 43).

Tabla 43. Media y mediana de supervivencia en función de los subgrupos de inmunotinción p53/ β -catenina

| Subgrupos de inmunotinciones: P53 / β -catenina | Media | | | | Mediana | |
|--|------------|--------------|---------------------------|---------|------------|--------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al | | Estimación | Error típico |
| | | | Límite inferior | Límite | | |
| Positivo / positivo | 120,763 | 13,672 | 93,967 | 147,560 | 108,900 | . |
| Negativo / negativo | 102,060 | 40,814 | 22,064 | 182,056 | 26,770 | . |
| Positivo / negativo | 165,470 | 45,120 | 77,035 | 253,905 | . | . |
| Negativo / positivo | 123,718 | 10,277 | 103,575 | 143,860 | 180,770 | 61,531 |
| Global | 131,712 | 8,994 | 114,084 | 149,340 | 180,770 | . |

En la representación de las gráficas de supervivencia, los subgrupos muestran un trazado similar: pérdida inicial de supervivencia entre los 90 primeros meses y una estabilización posterior. De tal forma que a los 180 meses sobreviven el 38,4% de los casos p53-/ β -catenina+; el 48,7% de los casos p53+/ β -catenina+. La supervivencia de los casos p53+/ β -catenina- y p53-/ β -catenina-, a pesar de ser de buen y mal pronóstico respectivamente, muestran trazados de curvas anormales, probablemente debido al escaso número de pacientes que los conforman (fig. 27).

Figura 27. Supervivencia específica según los subgrupos de inmunotinción p53/ β -catenina, en el compartimento profundo.



V. DISCUSIÓN

Los eventos moleculares implicados en el inicio y la progresión metastásica del CCR no están del todo aclarados. Pero parece evidente que la vía Wnt y su principal mediador, β -catenina, juegan un papel crítico en la patogénesis de la poliposis familiar adenomatosa y en gran parte de los CCR esporádicos (102).

Irónicamente, los elementos de la vía Wnt, por sí mismos, rara vez participan en la activación de la vía durante la carcinogénesis. Las mutaciones más frecuentes que imitan la estimulación general de Wnt son: a) las mutaciones que inactivan el gen APC, b) mutaciones que inactivan el gen de la axina, y c) las mutaciones que activan la β -catenina. De estas, la más común es la inactivación mutacional de la APC, la cual se detecta frecuentemente como un evento temprano (86, 89, 138, 139, 140).

El 70-90% de los cánceres colo-rectales tienen alguna mutación de la vía canónica de Wnt (83, 97, 98) que, en última instancia, conducen a la estabilización de β -catenina (falta de degradación), traslocación y acumulación de β -catenina en el núcleo celular, y la activación de genes implicados en la proliferación celular. (83,112).

El conocimiento de los mecanismos moleculares que transfieren la β -catenina desde su posición asociada a la membrana, al citoplasma y el núcleo, es esencial para comprender las funciones oncogénicas de la β -catenina estabilizada, que siguen siendo en gran parte desconocidas (144).

Además, la disminución de la adhesión celular mantiene la señalización de Wnt, estimulándose la migración celular y la formación de metástasis (90). Por lo tanto, la alteración en la localización subcelular de β -catenina es otro mecanismo importante, ya que la disociación de β -catenina de la membrana celular interfiere en las funciones de la E-cadherina (adhesión celular y supresión tumoral) (86, 141, 142).

Este fenotipo se detecta fácilmente en las neoplasias por métodos inmunohistoquímicos (150) y su activación a nivel nuclear representa un evento temprano en CCR (151).

Dado la heterogeneidad de los tumores de colon y recto, y para intentar comprender la progresión y el pronóstico de los mismos, en nuestra serie hemos planteado una división topográfica en dos compartimentos tumorales (superficial y profundo).

Esta división ya ha sido empleada en el estudio de otras neoplasias (vejiga, tiroides, glándulas suprarrenales, etc.) así como en el CCR, demostrándose como las células neoplásicas del compartimento tumoral profundo adquiere características morfológicas y biológicas propias de una mayor agresividad tumoral (171, 172, 173).

En nuestro caso, colon-recto, este planteamiento podría presentar una serie de dificultades inherentes a que se trata de tumores en un órgano tubular hueco (no sólido). De tal forma que, hallazgos histopatológicos como la necrosis tumoral (la cual no debe ser confundida con la ulceración del tumor en el compartimento superficial) así como el tipo de frente infiltrante o el grado histológico (que probablemente se encuentren relacionados con barreras físicas anatómicas como las capas musculares propias en el compartimento tumoral profundo), deben ser evaluados con cuidado.

A su vez, la forma de estudiar estos compartimentos topográficos ha sido mediante la selección de tres zonas anatómicas: tumoral superficial, tumoral profunda y mucosa sana; la extracción de cilindros de material parafinado de cada una de estas zonas; y la construcción de bloques de parafina de matrices de tejido. Este tipo de técnica, a la vez que permite el análisis de múltiples marcadores inmunohistoquímicos y moleculares, favorece la conservación de tejido restante en los bloques originales (209, 211, 218).

Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de 170 casos de CCRs. con un seguimiento mínimo de 15 años. En los cuales, la edad media de los pacientes fue de 68 años. En concordancia con la bibliografía revisada, los pacientes jóvenes (que tenían menos de 50 años) han mostrado una supervivencia menor al resto de la serie.

La localización tumoral más frecuente ha sido la de colon izquierdo-sigma, mientras que en la literatura se recoge que el segmento más usual es el recto-sigma. A su vez, algunos autores (22) estiman que esta localización está ligada a un peor pronóstico pero, en nuestro caso, la localización rectal ha mostrado una ligera mejoría en la supervivencia en comparación con el resto de localizaciones.

En este estudio, la evaluación del patrón de frente de infiltración ha demostrado ser una característica con significado estadístico, concretamente cuando este es de tipo

expansivo (independientemente de su localización microscópica en la pared intestinal) la supervivencia es superior a la del subtipo digitiforme, tal y como describe la literatura (160,161). Además, en los casos con patrón de infiltración de tipo digitiforme ha mostrado correlación significativa con la recidiva posterior al diagnóstico. De tal forma que, ante la presencia de recidiva, la mayoría de los tumores primarios mostraron un patrón digitiforme.

El tipo histológico en nuestra serie, al igual que lo referido en bibliografía, tiene una importancia pronóstica secundaria, observándose que el tipo de tumor no añade información útil por encima de otros parámetros como las metástasis en ganglios linfáticos, extensión del tumor, carácter del margen invasivo e infiltración linfocítica peritumoral. No obstante, la AJCC/UICC acepta que los únicos tipos histológicos que han demostrado tener significación pronóstica adversa independiente del estadio tumoral son el carcinoma de célula en anillo de sello y el carcinoma de célula pequeña (30).

En relación con este punto, en nuestra serie, el 83'2% de los casos fueron clasificados, en el momento del diagnóstico, como adenocarcinoma de tipo intestinal (convencional) y el 16'8% restante fueron clasificados como adenocarcinoma mucinoso con/sin células en anillo de sello (y no hubo casos que cumplieran requisitos de otros subtipos histológicos de adenocarcinoma).

Los adenocarcinomas mucinosos tienen una frecuencia que oscila entre el 10 y el 20% de todos los carcinomas colo-rectales (3).

Por lo general, los pacientes con este tipo de tumor tienen una supervivencia menor que aquellos con tumores no mucinosos. Algunos autores afirman que esta característica sólo es relevante para las lesiones situadas en el recto, otros defienden que el pronóstico de los CCR mucinosos sólo se relaciona con el estadio de la enfermedad y la extensión de la misma (189), mientras que otros señalan que estas tasas de supervivencia se relacionan con una naturaleza más agresiva del tipo histológico mucinoso (29).

Ikeda et al. (29) presentaron una clasificación original en dos subtipos de adenocarcinomas mucinosos (FIX y FLO) con comportamiento biológico distinto, la cual hemos intentado ver si se reproduce en nuestra serie.

El 5% de nuestros adenocarcinomas mucinosos presentaron un subtipo "floating" y el 11'8% un subtipo "fixed". Y han demostrado una estimación de supervivencia inferior a la presentada por el tipo intestinal (usual). Sin embargo, al analizar la variable mucina (como ausencia, presencia y el subtipo) se aprecia que la estimación de la media

de supervivencia perteneciente al subtipo de mucina “fixed” es la menor de todas. Mientras que la supervivencia de los pacientes con subtipo mucinoso “floating” o aquellos con ausencia de mucina son parecidas entre sí.

Por otra parte, al correlacionar los subtipos mucinosos con la extensión loco-regional, se ha observado significación estadística ($p=0,05$). La mayoría de casos clasificados con extensión loco-regional de tipo local o regional corresponden al subtipo “floating”, mientras que 3 de los 4 casos con LRD diseminado mostraron un patrón “fixed”.

Diversos autores han descrito un importante efecto del infiltrado linfocítico sobre la supervivencia, y consideran este parámetro como la variable relativa al tumor que mayor información pronóstica aporta, siendo, además, independiente del estadio (22). Las neoplasias que contienen márgenes infiltrantes expansivos e infiltrado inflamatorio crónico en la interfase entre el tumor y el tejido circundante muestran un mejor pronóstico que aquellos que carecen de estos hallazgos (39-41). También ha sido observada una relación inversa de la cantidad de infiltrado linfoplasmocitario con el número de metástasis (22).

En esta serie se ha valorado la presencia de infiltrado linfocitario peritumoral, teniendo en cuenta que este no debía ser confundido con componente inflamatorio mixto propio de ulceración superficial o de un proceso infeccioso /fistuloso concomitante al tumor. En estas condiciones, los casos con ausencia de inflamación crónica peritumoral han mostrado peor supervivencia que aquellos con presencia de inflamación.

A pesar de un importante grado de variabilidad entre observadores (33), el grado histológico ha sido demostrado, repetidamente, en estudios multivariantes como un factor pronóstico independiente a la hora de evaluar los CCRs, ya que se observa un claro descenso de la supervivencia conforme empeora la malignidad histológica del tumor. Especialmente, se ha demostrado que los tumores pobremente diferenciados tienen un pronóstico adverso (34).

En nuestra serie, todos los grados de diagnóstico emitidos originalmente fueron reevaluados y confirmados (según criterios actuales), en los cortes de hematoxilina – eosina originales por dos patólogos de forma independiente.

Tras lo cual, la mayoría de los casos fueron diagnosticados como moderadamente diferenciados, y se ha observado como la supervivencia desciende conforme más

indiferenciado se ha hecho el tumor, existiendo mayor similitud y peor supervivencia en los grados moderados y pobremente diferenciados.

Al estudiar la extensión loco-regional, hemos observado una disminución de la supervivencia conforme más extendido está el tumor. De tal forma que, en el subgrupo con extensión loco-regional diseminada tan sólo sobreviven el 9% de los pacientes. Sin embargo, el sistema TNM (basado en la extensión loco-regional y a distancia de tumores malignos) no ha mostrado resultados significativos en nuestra serie.

Los ganglios linfáticos afectados se han asociado a peor pronóstico cualquiera de las siguientes situaciones: afectación de numerosos ganglios linfáticos o una proporción alta de los ganglios resecaados, la afectación de aquellos ganglios que estén cercanos al margen mesentérico y/o a gran distancia del tumor primario o de localización retrógrada (3, 46, 47).

En nuestro estudio, los ganglios afectos fueron recogidos según su número neto, sin discriminar por la localización. De tal forma que los pacientes con presencia de afectación ganglionar tienen una estimación de supervivencia menor que aquellos con ganglios negativos. Sin embargo, no hemos encontrado diferencia pronóstica en función del número de ganglios afectos.

La clasificación de grupos de estadios patológicos (basadas en el TNM anatómico) se realiza generalmente después de la resección quirúrgica del tumor primario. Esta clasificación se ha descrito como el principal factor pronóstico del CCR en el momento del diagnóstico, de tal forma que la supervivencia del CCR a los 5 años es mucho mayor en estadios iniciales (75-90%) que en los avanzados (menor al 15%) (56). A medida que el estadio aumenta de I a IV, la supervivencia a 5 años desciende desde más del 90% a menos del 10% (57,3).

Nuestros resultados son concordantes, ya que se ha demostrado una relación significativa entre el aumento del estadio y la disminución de la supervivencia, de tal forma que a los 18 años de seguimiento, sobreviven el 55-70% de los pacientes con estadio iniciales y entre el 15,5-26,5% de los pacientes en estadio avanzados.

La proteína principal estudiada mediante técnicas inmunohistoquímicas en nuestra serie ha sido la β -catenina. El por qué de su elección radica en su importante papel en la oncogénesis de los CCRs., y su relación con el resto de variables clínicas e histopatológicas se relatan a continuación.

Dado que la traslocación de β -catenina del citoplasma al núcleo es una característica de su actividad oncogénica (83), que los CCRs. esporádicos presentan una distribución heterogénea de la proteína (asociándose a diferencias sustanciales en el pronóstico) (152-154), y que la mucosa colónica sana adyacente al tumor puede presentar inmunexpresión de β -catenina en membrana de forma homogénea (185); en este trabajo hemos intentado estudiar el patrón de comportamiento inmunohistoquímico de esta proteína en los dos compartimentos tumorales (superficial y profundo) y en la mucosa sana adyacente.

A su vez, hemos valorado que tipo de inmunexpresión de β -catenina mostraban las células; diferenciando entre positividad para membrana celular y citoplasma aumentada; y positividad para membrana, citoplasma y núcleo (es decir, traslocación nuclear).

Diversos estudios han demostrado tinción nuclear de β -catenina sólo en las células situadas en el frente invasivo del tumor. También se ha descrito que una tinción de β -catenina citoplasmática fuerte o nuclear en cáncer colo-rectal se correlaciona con un mayor crecimiento invasivo tumoral, una mayor susceptibilidad de recidiva de la enfermedad tras la cirugía, y una tasa de supervivencia más baja (17, 120, 121).

Por otra parte, otros autores han demostrado que una proporción de los cánceres colo-rectales tienen expresión de β -catenina reducida o ausente, relacionándose con un peor pronóstico (140,155).

Sin embargo, en nuestro estudio hemos determinado que la presencia de β -catenina (positividad para membrana celular y citoplasma aumentada; y positividad para membrana, citoplasma y núcleo) se relaciona con estimaciones de supervivencia inferiores al subgrupo con β -catenina negativa y, de forma más específica, la traslocación nuclear de β -catenina se asocia a la peor supervivencia de los tres subgrupos de inmunotinción.

En contraste con lo descrito por algunos autores (155), los pacientes que en nuestra serie mostraron negatividad para β -catenina son los que mejor supervivencia obtuvieron, sobreviviendo el 64% de los mismos. Además, el peor pronóstico lo ostentaron los tumores con presencia de β -catenina nuclear en el compartimento profundo.

Nuestros casos han mostrado un gradiente creciente de inmunoexpresión de β -catenina paralelo a la profundidad del tumor. De tal forma, que el compartimento tumoral superficial suele mostrar, con mayor frecuencia, tinciones de membrana y citoplasma, mientras que el compartimento profundo suelen presentar mayor inmunoexpresión nuclear.

Las tasas de supervivencia menores se corresponden, con el subgrupo que muestra presencia de β -catenina en membrana y citoplasma en el compartimento superficial y traslocación al núcleo en el compartimento profundo.

En lo referente al patrón infiltrante, existen estudios que afirman que el porcentaje de frente invasivo de tipo digitiforme (con gemación o “budding”) se asocia con un mayor riesgo de muerte en el CCR (160) y que este tipo de frente probablemente refleja un comportamiento tumoral asociado a la capacidad invasiva (161). Con respecto a este hecho, se ha demostrado que la β -catenina se expresa principalmente en el margen invasivo, en la mayoría de los CCR, y parece que esto se correlaciona con la cantidad de gemación (113). Análogamente, la acumulación de β -catenina nuclear en esas gemaciones o brotes celulares (“budding”) del frente invasivo de tipo infiltrante podrían proporcionar a las células tumorales la capacidad de separarse, migrar y difundir (112, 115, 185).

En nuestra serie, el tipo de frente infiltrante: expansivo o digitiforme (“budding”), también se ha correlacionado significativamente con la expresión de β -catenina. De los casos que mostraron un patrón digitiforme en la zona infiltrante, la mayoría mostró un patrón de inmunoexpresión de β -catenina nuclear (además de membrana y citosólica). El patrón expansivo fue menos frecuente, pero aún así también mostró un número sensiblemente mayor de casos en el subgrupo de inmunotinción nuclear (aunque esta diferencia fue menor que en el patrón digitiforme).

Los pacientes con inmunoexpresión de β -catenina positiva mostraron curvas de supervivencia en ambos subgrupos (frente expansivo y digitiforme) de trazado similar, aunque sólo sobrevivieron el 39,8% de los pacientes con patrón digitiforme.

Con respecto al tipo histológico, necrosis, patrón cribiforme, desmoplasia y la invasión vascular y/o linfática, en relación con el patrón de inmunoexpresión de β -catenina, no se ha encontrado correlación significativa en nuestro estudio.

No obstante, el tipo histológico intestinal muestra una mayor agrupación de casos en el patrón de tinción de membrana, citoplasma y núcleo. Y en el tipo mucinoso, representados, en nuestra serie, con un pequeño tamaño muestral, se observa una distribución similar. Esto hecho se repite con las características histopatológicas de necrosis, patrón cribiforme y desmoplasia. Si bien, esta diferencia es sensiblemente mayor en el compartimento tumoral profundo, donde se observa fundamentalmente tinción de β -catenina nuclear.

En cuanto a los adenocarcinomas mucinosos, Ikeda et al (29) observaron una acumulación de β -catenina nuclear en el 100% y 94,7% de los casos de “fixed” y “floating”, respectivamente (mostrando una frecuencia similar a la del NMC colo-rectal). Aunque no especifica que impacto podría suponer esto en la supervivencia, este resultado si indicaría la posibilidad de que tanto los CCR mucinosos (los dos subtipos histológicos) como los no mucinosos, surgen a través de la misma disfunción de la vía de señalización de Wnt.

En nuestro estudio, estos casos merecen una mención especial. Al intentar correlacionar la inmunoexpresión de β -catenina con la ausencia o presencia de mucina y, en su caso con el subtipo histológico: “fixed” o “floating”, hemos observado que no existe relación en el compartimento tumoral superficial. Sin embargo, en el compartimento tumoral profundo sí observamos diferencias significativas. Aunque son pocos casos los que presentan mucina, nuestros resultados discrepan con los de Ikeda et al (29), ya que la mayoría de los que tienen patrón “fixed” mostraron tinción nuclear de β -catenina, hecho no reproducido en los casos de patrón “floating”; mientras que una minoría de adenocarcinomas mucinosos fueron negativos para β -catenina.

El subgrupo que presenta mucina y es negativo para β -catenina muestra la estimación de supervivencia más baja, mientras que la estimación más alta corresponde al subgrupo con presencia de mucina y β -catenina en el citoplasma y/o membrana aumentada (sin evidencia de tinción nuclear). Por último, cabe añadir que todos los pacientes con algún tipo de inmunoexpresión de β -catenina fallecieron.

Con respecto a la gradación histológica y a la inmunoexpresión de β -catenina, esta no ha mostrado correlación estadística en la bibliografía consultada.

No obstante, en nuestra serie, el grado de diferenciación histológica no se ha relacionado con la inmunoeexpresión de β -catenina en el compartimento superficial, mientras que sí muestra una correlación significativa en el compartimento profundo.

La mayoría de los casos, como hemos mencionado anteriormente, fueron diagnosticados como moderadamente diferenciados y mostraron en el compartimento profundo un patrón predominante de β -catenina nuclear. Con respecto a la supervivencia, muestran peor pronóstico aquellos casos con traslocación nuclear.

Esto se agrava aún más en los casos con grado histológico pobremente diferenciado, donde los pacientes fallecieron en su totalidad.

Pancione et al (155) no encontraron correlación entre el estadio TNM y la inmunoeexpresión de β -catenina, pero si observaron diferencias al valorar de forma independiente la categoría T, ya que la mayoría de los casos catalogados como pT3 demostraron positividad para β -catenina. A su vez, también demostraron relación con la categoría N.

En este trabajo, el estadio TNM estudiado globalmente, tampoco ha mostrado diferencias con el patrón de inmunotinción de β -catenina. Al intentar correlacionar el tamaño tumoral (medido en centímetros) con la β -catenina, tampoco se observó ninguna relación significativa.

Curiosamente, la categoría T (del TNM) sí ha mostrado diferencias en el patrón de expresión de la β -catenina y, al igual que Pancione et al (155), el subgrupo pT3 es el que aglutina la mayoría de los casos que son positivos para β -catenina, aunque esto no ha demostrado tener relación con la supervivencia.

A su vez, el estudio de la categoría pN en relación con la β -catenina no ha sido relevante. No obstante, al valorar la afectación ganglionar como tal y la inmunoeexpresión de β -catenina, se aprecia como la presencia conjunta de afectación ganglionar y β -catenina positiva conlleva una disminución de la supervivencia.

Varios autores han demostrado que una proporción de los cánceres colo-rectales con expresión de β -catenina reducida o ausente se relacionan con una mayor frecuencia de metástasis, lo cual apoyaría la hipótesis de que las vías alternativas juegan un papel importante en la génesis tumoral del colon (140, 155).

Sin embargo, no detectaron diferencias en la tinción nuclear de β -catenina entre los tumores primarios y sus metástasis, lo que podría indicar que los fenómenos que provocan la translocación de la proteína al núcleo pueden tener un papel en la iniciación tumoral, pero no en su progresión (140, 153).

Pero al analizarlo en nuestra serie, las metástasis en el momento del diagnóstico (M del TNM) no mostraron ninguna relación con la inmunoexpresión de β -catenina.

Al estudiar las recidivas tumorales posteriores al diagnóstico, reagrupadas como presencia/ausencia de recidivas en órganos, si se ha apreciado de forma significativa como todos los casos con metástasis en órganos posteriores al diagnóstico muestran positividad para la β -catenina en el compartimento profundo del tumor primario.

Con respecto al estadio patológico, numerosos autores (62, 162, 163, 175), han descrito que el estadio tumoral de Dukes B se asocia con la expresión nuclear de β -catenina y un peor pronóstico. Sin embargo, Roca et al (159) publicaron unos resultados contradictorios.

En nuestro estudio, la clasificación de estadio patológico aplicada ha sido la basada en el TNM (ya que hoy en día, la clasificación de Dukes está en desuso). No obstante, y a diferencia de lo expuesto en la literatura, no se ha evidenciado ninguna correlación con la inmunoexpresión de β -catenina.

Los otros marcadores inmunohistoquímicos estudiados, en nuestra serie, han sido la proteína p53 y las proteínas reparadoras de errores génicos (pMLH-1, pPMS-2, y pMSH-2). La importancia de las mismas, y las relaciones entre ellas, la β -catenina y las demás variables se exponen a continuación.

La importancia de la proteína p53 nuclear radica en el papel que realiza, induce la detención del ciclo celular, la apoptosis, la senescencia celular, y la diferenciación en respuesta a señales de estrés endógenas y exógenas (162). En las células normales, se expresan niveles bajos de p53. La presencia de esta proteína p53 funcional, de tipo nativa o salvaje (wt), sirve para mantener la estabilidad genómica mediante la eliminación de las células con daño genómico del “pool proliferante”, así como por facilitar la reparación de tales daños.

En base a lo cual, el gen TP53 es un objetivo de mutaciones muy frecuentes en más de 50% de los cánceres humanos, incluyendo CCR (163, 165, 166). Ya que la eliminación de la capacidad de supresión tumoral parece ser un requisito previo para la conversión de células transformadas del epitelio colo-rectal en un tumor maligno.

Curiosamente, las mutaciones de p53 suelen ocurrir relativamente tarde durante el curso de la carcinogénesis colo-rectal. La mayoría de las mutaciones de p53 conllevan

un aumento de la estabilidad proteica (ausencia de degradación) y la acumulación en los núcleos de las células tumorales.

La sobreexpresión nuclear de p53 se ha relacionado con la afectación ganglionar, las metástasis a distancia y un peor pronóstico, no obstante, la importancia clínica de esta sobreexpresión sigue siendo controvertida (174).

En contraste con lo anterior, nuestro estudio demuestra que los pacientes con tumores p53 positivos en el compartimento profundo mostraron una supervivencia superior a los casos p53 negativos.

Ikeda et al (29), demostraron que las anomalías en la vía de señalización p53 en el tipo FIX son similares a los de CCR no mucinosos, lo que sugiere que se desarrollan a través de mecanismos similares. Por otra parte, la frecuencia de alteraciones en p53 en el tipo FLO fue menor que en los CCR no mucinosos y demostró tener un peor pronóstico, lo que sugeriría que se desarrolla a través una vía diferente.

Al estudiar, en nuestra serie, la relación entre el tipo histológico tumoral y la inmunoexpresión de p53, se aprecia que la mayoría de los CCRs. de tipo mucinoso presentan valores de p53 bajos (inferior a 30 núcleos positivos) en ambos compartimentos, mientras que esta diferencia es apenas distinguible en los CCRs. no mucinosos.

Pero cuando se ha intentado reproducir este evento entre los subtipos FIX y FLO, no se ha obtenido correlación significativa. Por lo que, a diferencia de Ikeda et al (29), en nuestra serie no hemos podido evidenciar un comportamiento inmunohistoquímico de p53 distintivo entre los subtipos descritos de CCRs. mucinosos.

Con respecto a la relación entre β -catenina y p53, autores como Damalas et al. (62) establecieron que la sobreexpresión de β -catenina puede promover una acumulación de p53 funcional (mediante interferencias en la degradación proteosomal). Este aumento de p53 restringiría la proliferación tumoral (función supresora tumoral) y, como consecuencia de otras alteraciones genéticas, posteriormente se produciría una activación de dicha p53. Esto podría explicar la aparición tardía de mutaciones de p53 en el cáncer colo-rectal.

A su vez, la estabilización y acumulación de p53 regula a la baja la β -catenina (aumentando su degradación proteosomal) mediante un mecanismo de bucle automático regulador (“feed-back” negativo), todavía no bien conocido (62,176).

Este bucle de control podría servir como freno a los efectos oncogénicos de la β -catenina desregulada. Por lo tanto, su alteración (por mutaciones en gen TP53), podría incapacitar la inhibición sobre la actividad oncogénica de β -catenina, lo que contribuiría a la progresión del tumor.

Pancione et al (155) analizaron la expresión de p53 y β -catenina en el mismo tumor y demostraron que el subgrupo con negatividad para β -catenina y positividad nuclear de p53 está relacionado con las metástasis a distancia y con una supervivencia corta.

Sin embargo, otros autores (185) evidenciaron que la acumulación citoplásmica de β -catenina parecía desencadenar la sobreexpresión de p53 en lugar de su translocación nuclear. Además, sugirieron que las funciones de los patrones de β -catenina podrían ser diferentes: así, el patrón citoplasmático y/o de membrana probablemente pueda conducir a las alteraciones de p53; mientras que el patrón de membrana, citoplasmático y nuclear se relacione con la invasión celular.

No obstante, los enlaces moleculares entre β -catenina y p53 en CCRs. con progresión metastásica son todavía desconocidos, y la importancia clínica de esta relación sigue siendo controvertida.

Con estos antecedentes en la literatura, en nuestro estudio se ha valorado la relación entre la inmunoexpresión de β -catenina y p53; considerando distintas clasificaciones de inmunotinción.

Esta correlación ha resultado significativa tanto en el compartimento tumoral superficial como en el profundo, independientemente de cómo se hayan reagrupado los valores de β -catenina. De tal forma que la inmunoexpresión de p53 coincidía con subgrupos de tinción positiva de β -catenina, lo cual ha sido más patente en el compartimento profundo.

Si reagrupamos los pacientes por subgrupo de inmunotinción, y lo correlacionamos con la supervivencia, apreciamos que el subgrupo con doble negatividad para p53 y β -catenina es el que muestra una supervivencia más baja, mientras que la más alta corresponde a aquellos pacientes cuyos tumores mostraron positividad para p53 nuclear y ausencia de inmunotinción para β -catenina.

Además, al prestar atención al subgrupo con presencia de p53 nuclear, observamos como los que mostraron positividad para β -catenina mostraron un pronóstico desfavorable.

Todos estos resultados respaldarían la hipótesis del mecanismo de bucle regulador ya que, en nuestra serie, los pacientes con presencia de p53 nuclear (presumiblemente estabilizada por un incremento inicial de β -catenina) y negatividad de β -catenina (probablemente debida a un aumento en la degradación estimulado por p53) son los que mejor supervivencia presentan. Y, por lo tanto, se contraponen a los expuestos por Pancione et al (155).

En lo referente a la funcionalidad de los patrones de β -catenina, en nuestro estudio no hemos podido verificar que la traslocación nuclear conlleve mayor posibilidad de metástasis o que la localización citoplasmática resulte en un incremento de expresión de p53.

En cuanto al estadio patológico, también ha mostrado correlación de forma significativa estas dos variables, ya que la mayoría de los casos del estadio III fueron doblemente positivos para p53 y β -catenina en el compartimento tumoral profundo. Aunque esto no ha podido ser contrastado con la literatura revisada.

El estado de inestabilidad de microsatélites (IMS) es un factor pronóstico establecido ya que ayuda a predecir la respuesta a tratamiento en los pacientes con CCR. Se ha observado en el 90% de los CCR hereditarios no – polipósicos, y alrededor del 15% de los CCR esporádicos, asociándose con alteraciones de los genes de reparación, tales como MLH-1 y MSH-2 (3,197).

Los CCRs. con IMS, muestran una progresión tumoral rápida de adenoma a carcinoma y se asocian a un mejor pronóstico y mejor respuesta a quimioterapia (198).

En los CCR esporádicos, la IMS-A suele deberse a la metilación del gen promotor de MLH-1, lo que se traduce en la pérdida epigenética de la expresión proteica de MLH-1 y de su compañero de unión, PMS2.

Normalmente, se estudia por técnicas moleculares (PCR), aunque se ha demostrado que la detección de pérdida de proteínas reparadoras pMSH2 y pMLH1 estudiadas por técnicas inmunohistoquímicas se correlaciona fielmente con los resultados obtenidos por PCR (199). Además, el diagnóstico indirecto de IMS-A usando marcadores inmunohistoquímicos muestra mayor precisión en los CCRs. esporádicos que en los hereditarios (3).

El perfil de proteínas reparadoras (MMR) ha demostrado cierta correlación con el patrón de infiltración histológica y la topografía en varias neoplasias (p.e. el carcinoma urotelial de vejiga músculo-infiltrante), así como en el CCR (193, 194, 195).

En este último, se ha observado una pérdida de expresión de proteínas MLH1 y MSH2, y un incremento de la inestabilidad de microsatélites en el compartimento profundo. De tal forma que los tumores que son muestran EMS en el compartimento superficial se vuelven inestables en el compartimento profundo (193).

Por lo tanto, y debido a la heterogeneidad tumoral topográfica propia del CCR, al menos, se deben obtener dos muestras de cada tumor para el estudio de proteínas MMR, preferiblemente del compartimento superficial (por encima de la muscular propia) y profundo (células tumorales infiltrando la capa muscular propia) (200).

La vía Wnt / β -catenina se ha asociado con un estado específico de inestabilidad de microsatélites en los CCR esporádicos (202, 203, 204, 205, 206). La estabilidad de microsatélites o la baja inestabilidad de microsatélites (EMS/IMS-B) juegan un pronóstico más desfavorable que los CCR con inestabilidad alta de microsatélites (IMS-A) debido a una acumulación aberrante de β -catenina nuclear. No obstante, el mecanismo subyacente no ha sido clarificado (155, 202, 203).

Pancione et al (155), demostraron en su serie que existía una asociación entre un patrón de expresión determinado de MLH-1 y MSH-2 con expresión de β -catenina nuclear y peor pronóstico (155).

Además, los tumores que eran negativos para MLH-1, fueron significativamente negativos para β -catenina, lo cual fue más frecuente en el colon proximal y se asociaba a estadios de Duke C-D y a peor pronóstico. Por lo que también sugirieron que pudiera existir una relación entre las vías moleculares de Wnt y MSI que promoviera la progresión tumoral en el CCR. (155,203).

Por otra parte, Valentini et al (182), evaluaron la traslocación e incremento nuclear de β -catenina nuclear y su relación con los MMR, demostrando un patrón similar entre tumores con IMS y con EMS.

En este serie hemos intentado verificar la correlación entre la vía Wnt (β -catenina) y el estado de IMS, únicamente mediante técnicas inmunohistoquímicas para la expresión de proteínas reparadoras.

Para ello, hemos evaluado la expresión de pMLH1, pPMS2 y pMSH2 tanto en el compartimento superficial como en el profundo.

Pero a diferencia de algunas referencias bibliográficas, no hemos encontrado correlación entre la inmunoeexpresión de dichas proteínas reparadoras y la β -catenina. Como tampoco hemos podido verificar relación alguna entre ellas y la topografía tumoral, otras variables histopatológicas o el pronóstico/evolución de los pacientes.

Ante la falta de concordancia, nos hemos planteado la posibilidad de que el material histológico del que disponemos (tejido tumoral parafinado desde el año 1994-98), no cumpliera las condiciones ideales de fijación para el estudio inmunohistoquímico de proteínas reparadoras.

Ya que, tal y como advierte la bibliografía (185, 201), el tiempo de fijación en formol puede ser responsable de la pérdida de detección de proteínas MMR, afectando con mayor gravedad a la mucosa sana que a la tumoral.

VI. CONCLUSIONES

1. El carcinoma colo-rectal (CCR) es un tumor heterogéneo, advirtiéndose grandes variaciones en el comportamiento biológico entre los compartimentos tumorales superficial y profundo.

2. La inmunoexpresión de β -catenina en el CCR es muy variable, pero, debido a su papel oncogénico y a su relación con otras vías moleculares (p53 e IMS), juega un papel importante en el pronóstico de los pacientes.

3. En este estudio hemos evaluado -de forma original- el comportamiento biológico de la β -catenina, y su interacción con p53 y las proteínas reparadoras de errores en la transcripción de ADN, desde un enfoque compartimental o topográfico, habiéndose estudiado las posibles correlaciones con otros datos de interés histopatológicos y de pronóstico/evolutivo.

Y así, la inmunoexpresión de β -catenina ha mostrado una mayor relación con el resto de variables -histopatológicas e inmunohistoquímicas- en el compartimento tumoral profundo que en el superficial. A su vez, la inmunoexpresión de β -catenina nuclear en el compartimento profundo se ha asociado a peor pronóstico y menor supervivencia.

4. Con respecto a las variables histopatológicas; el patrón infiltrante digitiforme, los adenocarcinomas mucinosos de tipo “fixed”, los grados moderada y pobremente diferenciados y las metástasis advertidas con posterioridad al diagnóstico, han demostrado una notable correlación con la existencia de inmunoexpresión de β -catenina nuclear y con menor supervivencia.

5. Las neoplasias con doble negatividad para p53 y β -catenina en el compartimento profundo son las que peor supervivencia han demostrado. Mientras que el mejor pronóstico lo presentan las neoplasias con positividad para p53 y negatividad para β -catenina. Este hecho podría sugerir la existencia de un “bucle de control regulador” entre p53 y β -catenina. Sin embargo, en este estudio, la inmunoexpresión de proteínas reparadoras no han mostrado correlación significativa con la inmunoexpresión de β -catenina.

6. A la vista de los resultados obtenidos, concluimos que el análisis combinado de β -catenina y p53 podría tener importancia pronóstica, como marcadores predictores de la progresión de la enfermedad, y contribuir a una identificación de pacientes con alto riesgo de mortalidad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 7-33.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available at: <http://globocan.iarc.fr>.
3. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2010.
4. Jensen OM, Parkin DM, MacLennan R, Muir CS, Skeet RG. Cancer registration: Principles and methods. IARC Scientific Publications No. 95 ed. Lyon, France: IARC Scientific Publications No. 95; 1991.
5. Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S, Garzón M, Pizarro-Moreno A, Giráldez-Gallego A, Cordero C. Study of mortality from colorectal cancer in the Andalusian population. *Rev Esp Enferm Dig* 2011;103 (6):289–93.
6. Ferlay J, Parkin DM, Curado MP, Bray F, Edwards B, Shin HR, et al. Cancer incidence in five continents, volumes I to IX: IARC CancerBase no. 9 [internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.
7. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 2009;59:366-78.
8. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe sobre la salud de los españoles. Cáncer. Información disponible a diciembre de 2003. Disponible en: www.ce.isciii.es/cancer/salud-cancer-2003.pdf;2003.
9. Ribes J, Navarro M, Clèries R, Esteban L, Pareja L, Binefa G, et al. Colorectal cancer mortality in Spain: trends and projections for 1985-2019. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21(1):92-100.
10. [Sánchez MJ](#), [Payer T](#), [De Angelis R](#), [Larrañaga N](#), [Capocaccia R](#), [Martinez C](#). Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol*. 2010 May;21 Suppl 3: iii30–iii36, 2010.
11. Grau J, Serradesanferm A, Polbach S et al. [Colorectal cancer screening programs in the population at average risk in the European Union and Spain.] *Gastroenterol Hepatol* 2010; 33: 111–118.
12. Kolligs FT, Crispin A, Munte A, Wagner A, Mansmann U, et al. (2011) Risk of Advanced Colorectal Neoplasia According to Age and Gender. *PLoS ONE* 6(5): e20076. doi:10.1371/journal.pone.0020076.

13. C.n.e.isciii.es [Internet]. Madrid: Centro nacional de epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Ariadna: mortalidad por cáncer y otras causas. 2012 [citado 4 abr 2013]. Disponible en: <http://cne.isciii.es/morta/consulta.php>.
- 14 Ribes J, Navarro M, Clèries R, Esteban L, Pareja L, Binefa G, et al. Colorectal cancer mortality in Spain: trends and projections for 1985-2019. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21(1):92-100.
15. Ruiz-Ramos M, Escolar A, Hermosín T. Mortalidad por cáncer colorrectal en Andalucía: aportaciones al cribado poblacional. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97:104-14.
16. Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:925-43.
17. Gonzalez CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer* 2010;46(14):2555-62.
18. Slattery ML, Potter JD, Friedman GD, Ma KN, Edwards S. Tobacco use and colon cancer. *Int J Cancer* 1997;70:259-64.
19. Berghofer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN. Obesity prevalence from a European perspective: A systematic review. *BMC Public Health* 2008;8:200.
20. Bezerra-de-Souza DL, Bernal MM, Gómez FJ, Gómez GJ. Predictions and estimations of colorectal cancer mortality, prevalence and incidence in Aragon, Spain, for the period 1998-2022. *Rev Esp Enferm Dig* 2012; 104:518-523.
21. Gonzalo López-Abente, Javier García-Pérez, Pablo Fernández-Navarro, et al. Colorectal cancer mortality and industrial pollution in Spain. *BMC Public Health* 2012, 12:589.
22. Rosai and Ackerman's. *Surgical Pathology*. 9º ed.USA: Mosby; 2004. Volume 1. Pag 799-825.
23. Ferenschild FTJ, Vermaas M, Verhoef C, et al. Total Pelvic Exenteration for Primary and Recurrent Malignancies. *World J Surg* 2009; 33:1502–1508.
24. Papagiorgis P, Oikonomakis I, Karapanagiotou I, et al. The impact of tumor location on the histopathologic expression of colorectal cancer. *J BUON*. 2006;11(3):317-21.
25. Gómez-Domínguez E, Trapero-Marugán M, del Pozo AJ. The colorectal carcinoma prognosis factors. Significance of diagnosis delay. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 322-329.204.
26. Vicioso Recio L y Matilla Vicente A. Factores patobiológicos de valor pronóstico en el carcinoma colo-rectal. *Revista Andaluza de Digestivo* 1994;17:114-122.
27. Glasgow SC, Bleier II, Burgart LJ, et al. Meta-analysis of histopathological features of primary colorectal cancers that predict lymph node metastases. *J Gastrointest Surg*. 2012;16(5):1019-28. doi: 10.1007/s11605-012-1827-4.

28. Wolmark N, Cruz I, Redmond CK, et al. Tumor size and regional lymph node metastasis in colorectal cancer. A preliminary analysis from the NSABP clinical trials. *Cancer* 1983;51:1315-22.
29. Satoshi Ikeda, Yosuke Shimizu, Masahiko Fujimori, et al. Immunohistochemical and Mutational Analyses of β -catenin, Ki-ras, and p53 in Two Subtypes of Colorectal Mucinous Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9: 5660-5665.
30. College of American Pathologist (CAP) net [Internet]. USA; 2012 [actualizado Jun 2012; citado 16 Oct 2012]. Disponible en:
http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2012/Colon_12protocol_3200.pdf.
31. Compton CC, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors consensus conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 2000;88:1739-57.
32. Compton CC. Colorectal cancer. In: Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Sobin LH, eds. *Prognostic Factors in Cancer*. New York, NY: Wiley-Liss; 2006:133-137.
33. Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology*. 1986;10(5):437-459.
34. Compton CC. Colorectal cancer. In: Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Sobin LH, eds. *Prognostic Factors in Cancer*. New York, NY: Wiley-Liss; 2006:133-137.
35. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):979-994.
36. Vicioso L, Blanes A y Matilla A. Estudio histoquímico de lectinas en carcinomas, mucosa adyacente y epitelio normal de colon y recto. *Patología*, 1991; 24: 317- 324.
37. Horn A, Dahl O, Morild I. Venous and neural invasion as predictors of recurrence in rectal adenocarcinoma. *Colon Rectum* 1991; 34:798.
38. Dirschmid K, Lang A, Mathis G, et al. Incidence of extramural venous invasion in colorectal carcinoma: findings with a new technique. *Hum Pathol* 1996;27:1227-30.
39. Graham F, McSherry CK. Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma. A potential histologic prognosticator. *Mod Pathol* 1990;3:332-5.
41. Harrison KC, Dean PJ, el-Zeky F, et al. From Dukes through Jass. Pathological prognostic indicators in rectal cancer. *Hum Pathol* 1994;25:498-505.
41. Spratt JS, Spjut HJ. Prevalence and prognosis of individual clinical and pathologic variables associated with colorectal carcinoma. *Cancer* 1967;20:1976-85.
42. J R Jass. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 1986; 39: 585-589.

43. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, et al. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 1989;63:539-43.
44. Goldstein NS, Turner JR. Lymph node recoveries from 2427 pT3 colorectal resection specimens spanning 45 years: recommendations for a minimum number of recovered lymph nodes based on predictive probabilities. *Am J Surg Pathol* 2002;26:179-89.
45. Gunn J, McCall JL, Yun K, et al. Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse-transcription polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1996;75:611-16.
46. Jass JR., Atkin WS, Cuzick J, Bussey et al. The grading of rectal cancer. Historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986; 10: 437.
47. Halvorsen, TB, Seim, E. Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 1989; 42:162.
48. Glenn F, McSherry CK. Carcinoma of the distal large bowel-32-year review of 1026 cases. *Ann surg* 1966; 163: 338-349.
49. Young RH, Hart WR. Metastatic intestinal carcinomas simulating primary ovarian clear cell carcinoma and secretory endometrioid carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of five cases. *Am J Surg Pathol* 1998;22:805-15.
50. Goldstein NS. Lymph node recoveries from 2427 pT3 colorectal resection specimens spanning 45 years: recommendations for a minimum number of recovered lymph nodes based on predictive probabilities. *Am J Surg Pathol* 2002, 26: 179-189.
51. Betés Ibáñez M, Muñoz Navas M. Factores pronósticos del cáncer colorrectal. *An Med Interna (Madrid)* 2008; 25: 317-320.
52. Dukes CE. Histologic grading of rectal carcinoma. *Proc R Soc Med* 1937;30:371-76.
53. Dukes CE. Peculiarities in the pathology of cancer of the anorectal region. *Proc R Soc Med* 1946;39:763-65.
54. Kiriakos M. The President's cancer, the Dukes classification, and confusion. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:1063-66.
55. Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954;139:846-51.
56. Ciccolallo L, Capocaccia R, Coleman MP, Berrino F, Coebergh JW, Damhuis RA, et al. Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: Role of stage at diagnosis and surgery. *Gut* 2005;54:268-73.
57. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-65.

58. Rodriguez-Moranta F, Salo J, Arcusa A, Boadas J, Pinol V, Bessa X, et al. Postoperative surveillance in patients with colorectal cancer who have undergone curative resection: a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. *J Clin Oncol* 2006; 24: 386-93.
59. Lupinacci R, Penna C, Nordlinger B. Hepatectomy for resectable colorectal cancer metastases indicators of prognosis, definition of resectability, techniques and outcomes. *Surg Oncol Clin N Am* 2007; 16:493-506..
60. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 1: 759-67.
61. Markowitz S, Bertagnolli, M. Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;361:2449-60
62. Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, et al. Excess β -catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J* 1999;18: 3054-63.
63. Wong J, Hawkins N, Ward R. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis *Gut* 2007; 56: 140-148
64. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-7.
65. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17:271-2.
66. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary non-polyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38. [Erratum, *Cell* 1994;77:167.]
67. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-61.
68. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8698-702.
69. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-90.
70. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-8. [Erratum, 1993;259:878.]
71. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, et al. Mutational inactivation of transforming growth factor β receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* 1999;59:320-4.

72. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* 2008;29:992-1006.
73. Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res* 2008;68:1953-61. [Erratum, *Cancer Res* 2008;68:6859.]
74. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin use and risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med* 2007;356:2131-42.
75. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
76. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:337-45.
77. Li FJ and Lai M. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009;10:219-229.
78. Payá A, Alenda C, Jover R et al. Mismatch-repair deficiency colorectal carcinoma. Identification keys and clinical relevance. *Rev Esp Patol* 2006;39:201-208.
79. Shen L, Toyota M, Kondo Y et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *PNAS* 2007;20:18654-18659.
80. Kolligs FT, [Bommer G](#), [Göke B](#). Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. [Digestion](#). 2002;66(3):131-44.
81. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837–1851.
82. Tarapore RS, Siddiqui IA, Mukhtar H. Modulation of Wnt/b-catenin signaling pathway by bioactive food components. *Carcinogenesis*, 2012;33(3):483–491.
83. Giles RH, van Es JH, [Clevers H](#) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. [Biochim Biophys Acta](#). 2003;1653(1):1-24.
84. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol* 2002; 3(Review):S3001.
85. Ben-Ze'ev, A, Geiger, B. Differential molecular interactions of β -catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol* 1998;10: 629–639.
86. Fuchs SY, Ougolkov AV, Spiegelman VS, et al. Oncogenic b-Catenin Signaling Networks in Colorectal Cancer. *Cell Cycle* 2005, 4:11, 1522-1539.
87. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with b-catenin, APC and GSK3 β . *Science* 1998; 280: 596–599.

88. Ikeda, S., Kishida, M., Matsuura, et al. GSK-3 α -dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by b-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene*, 2000; 19; 537–545.
89. Pinto D, Clevers H. Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell* 2005;97:185-96.
90. Fodde R, Brabletz T. WNT/ β -catenin signalling in cancer stemness and malignant behaviour. *Cell Biol* 2007;19:150-8.
91. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of b-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996; 382: 638–642.
92. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422–426.
93. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, et al. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 1999;18:2883–2891.
94. Kolligs FT, Nieman MT, Winer I, Hu G, et al. ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell* 2002;1:145–155.
95. [Barker N](#), [Hurlstone A](#), [Musisi H](#), et al. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. [EMBO J](#). 2001;20(17):4935-43.
96. Parveen N, Ul Hussain N, Pandith AA. Diversity of axin in signaling pathways and its relation to colorectal cancer. *Med Oncol*. 2011; 28:S259–S267.
97. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000;103:311–320.
98. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:55–67.
99. Vider B-Z, Zimmer A, Chastre E, Prevot S, Gespach C, Estlein D, Wolloch Y, Tronic SR, Gazit A, Yaniv A. Evidence for the involvement of the Wnt2 gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 1996; 12:153-8.
100. Smith K, Bui TD, Poulsom R, Kaklamanis L, Williams G, Harris AL. Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 81:496-502.
101. Hiscox S, Jiang WG. Hepatocyte growth factor/ scatter factor disrupts epithelial tumour cell-cell adhesion: Involvement of beta-catenin. *Anticancer Res* 1999;19:509–517.
102. Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16:51-9.

103. [Polakis P](#). The oncogenic activation of beta-catenin. [Curr Opin Genet Dev](#). 1999;9(1):15-21.
104. [Webster MT](#), [Rozycka M](#), [Sara E](#), et al. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. [Genes Chromosomes Cancer](#). 2000 Aug;28(4):443-53.
105. Pukrop T, Binder C. The complex pathway of Wnt5a in cancer progression. *J Mol Med* 2008;86:259-66.
106. Caldwell GM, Jones C, Gensberg K, et al. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 2004; 64: 883 –888.
107. Caldwell GM, Jones CE, Taniere P, et al. Wnt antagonist sFRP1 is downregulated in premalignant large bowel adenomas. *Br J Cancer*, 2006; 94: 922–927.
108. Caldwell GM, Jones CE, Soon Y, et al. Reorganisation of Wnt-response pathways in colorectal tumorigenesis *British Journal of Cancer*, 2008; 98: 1437 – 1442.
109. DeAlmeida VI, Miao L, Ernst JA, et al. The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo. *Cancer Res*, 2007; 67: 5371–5379.
110. [Peifer M](#), [Polakis P](#). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. [Science](#). 2000;287(5458):1606-9.
111. [Sato N](#), [Mizumoto K](#), [Nakamura M](#), et al. Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. [Cancer Genet Cytogenet](#). 2001;126(1):13-9.
112. Brabletz T, Jung A and Kirchner T: Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 2002; 441: 1-11.
113. Jass JR, Barker M, Fraser L, et al: APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol*, 2003; 56: 69-73.
114. Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, et al: Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer*, 2000; 89: 2025-2037.
115. Martensson A, Oberg Ake, Jung A, et al. β -catenin expression in relation to genetic instability and prognosis in colorectal cancer. *Oncology Reports*, 2007; 17: 447-52.
116. [Herter P](#), [Kuhnen C](#), [Müller KM](#). Intracellular distribution of beta-catenin in colorectal adenomas, carcinomas and Peutz-Jeghers polyps. [J Cancer Res Clin Oncol](#). 1999;125(5):297-304.
117. [Chan TA](#), [Wang Z](#), [Dang LH](#), et al. Targeted inactivation of CTNNB1 reveals unexpected effects of beta-catenin mutation. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2002;99(12):8265-70.
118. [van Noort M](#), [Meeldijk J](#), [van der Zee R](#), et al. Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. [J Biol Chem](#). 2002 17;277(20):17901-5.

119. [van de Wetering M](#), [Sancho E](#), [Verweij C](#), et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. [Cell](#). 2002;111(2):241-50.
120. Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, et al. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 2000;59:302– 309.
121. Ougolkov AV, Yamashita K, Mai M, et al. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. *Gastroenterology* 2002;122:60– 71.
122. Legoix P, Bluteau O, Bayer J. Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. *Oncogene* 1999;18:4044–4046.
123. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000; 24:245–250.
124. Tanaka S, Akiyoshi T, Mori M, et al. A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/beta-catenin signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10164–10169.
125. Bian YS, Osterheld MC, Bosman FT, et al. Nuclear accumulation of beta-catenin is a common and early event during neoplastic progression of Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* 2000;114:583– 590.
126. Park WS, Oh RR, Park JY et al. Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res* 1999;59:4257–4260
127. Abraham SC, Wu TT, Klimstra DS, et al. Distinctive molecular genetic alterations in sporadic and familial adenomatous polyposis- associated pancreatoblastomas: Frequent alterations in the APC/beta-catenin pathway and chromosome 11p. *Am J Pathol* 2001;159: 1619–1627.
128. Abraham SC, Wu TT, Hruban RH, et al. Genetic and immunohistochemical analysis of pancreatic acinar cell carcinoma: Frequent allelic loss on chromosome 11p and alterations in the APC/betacatenin pathway. *Am J Pathol* 2002;160:953– 962.
129. Abraham SC, Klimstra DS, Wilentz RE, et al. Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor beta-catenin mutations. *Am J Pathol* 2002;160:1361–1369.
130. Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, et al. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res* 1999;59:3346– 3351.
131. Wright K, Wilson P, Morland S, et al. Beta-catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: Exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumours. *Int J Cancer* 1999;82:625–629.

132. Rimm DL, Caca K, Hu G, et al. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999;154:325–329.
133. Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, et al. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:1811–1815.
134. Voeller HJ, Truica CI, Gelmann EP. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res* 1998;58:2520–2523.
135. Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, et al. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res* 1999;59:3880–3882.
136. Sunaga N, Kohno T, Kolligs FT, et al. Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (beta-catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:316–321.
137. Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, et al. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer Res* 1998; 58:896–899.
138. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of b-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in b-catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787–1790.
139. Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a b-catenin–Tcf complex in APC–/– colon carcinoma. *Science* 1997: 275, 1784–1787.
140. Pancione M, Forte N, Fucci A, et al. Prognostic role of β -catenin and p53 expression in the metastatic progression of sporadic colorectal cancer. *Human Pathology* 2010; 41: 867–876.
141. Ozawa M, Kemler R. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin-catenin complex. *J Biol Chem* 1998; 273:6166–70.
142. Monga SP, Mars WM, Pediaditakis P, Bell A, Mule K, Bowen WC, Wang X, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of b-catenin after Met-b-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res* 2002;62:2064–71.
143. Heppner Goss K, Groden J. Biology of the APC tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000; 18:1967–79.
144. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates b-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2000; 2:653–60.
145. Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of b-catenin. *Cancer Res* 2004; 64:6363–7.
146. Downward J. Ras signaling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:49–54.

147. Ilyas M, Efsthathiou JA, Straub J, Kim HC, Bodmer WF. Transforming growth factor b stimulation of colorectal cancer cell lines: Type II receptor bypass and changes in adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:3087-91.
148. Dedhar S. Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:250-6.
149. Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kB: Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1470:M55-62.
150. Wong NA, Pignatelli M. b-catenin-a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002; 160:389-401.
151. Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günther K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein b-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract* 1998; 194:701-4.
152. Suzuki H, Masuda N, Shimura T, et al. Nuclear β -catenin expression at the invasive front and in the vessels predicts liver metastasis in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2008;28:1821-30.
153. Horst D, Reu S, Kriegl L, et al. The intratumoral distribution of nuclear β -catenin is a prognostic marker in colon cancer. *Cancer* 2009;115: 2063-70.
154. Bandapalli OR, Dihlmann S, Helwa R, et al. Transcriptional activation of the β -catenin gene at the invasion front of colorectal liver metastases. *J Pathol* 2009;218:370-9.
155. Pancione M, Forte N, Sabatino L, et al. Reduced β -catenin and PPAR γ expression levels are associated with colorectal cancer metastatic progression: correlation with tumor-associated macrophages, cyclooxygenase - 2, and patient outcome. *Hum pathology* 2009;40:714-25.
156. Bondi J, Bukholm G, Nesland JM, et al: Expression of nonmembranous beta-catenin and gamma-catenin, c-Myc and cyclin D1 in relation to patient outcome in human colon adenocarcinomas. *APMIS*, 2004: 112: 49-56.
157. Cheah PY, Choo PH, Yao J, et al: A survival-stratification model of human colorectal carcinomas with beta-catenin and p27kip1. *Cancer*, 2002; 95: 2479-2486.
158. Baldus ES, Mönig PS, Huxel S, et al: MUC1 and nuclear β -catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clin Cancer Res*, 2004; 10: 2790-2796.
159. Roca F, Mauro VL, Bonadeo F, et al: Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9) and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma. *J Surg Oncol*, 2006 ; 93: 151-160.
160. Park KJ, Choi HJ, Roh MS, et al: Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum* 48: 1597-1602, 2005.

161. Ueno H, Murphy J, Jass JR, et al: Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*, 2002; 40: 127-132.
162. Riley T, Sontag E, Chen P, et al. Transcriptional control of human p53- regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:402-12.
163. Feng Z, Hu W, Rajagopal G, et al. The tumor suppressor p53: cancer and aging. *Cell Cycle* 2008;7:842-7.
164. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-22.
165. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998; 12: 2973–2983.
166. Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2–p53 circuit. *Cell* 1998; 95: 5–8.
167. Baithun SI, Naase M, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Molecular and kinetic features of transitional cell carcinomas of the bladder: biological and clinical implications. *Virchows Arch.* 2001 Mar;438(3):289-97.
168. Haupt Y, Maya R, Kazaz A. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387: 296–299.
169. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88: 593–602.
170. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 1998; 12: 2424–2433.
171. Diaz-Cano SJ, Blanes A, Rubio J, Matilla A, Wolfe HJ. Molecular evolution and intratumor heterogeneity by topographic compartments in muscle invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Lab Invest* 2000;80:279–289.
172. Pozo L, Sanchez-Carrillo JJ, Martinez A, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Differential kinetic features by tumour topography in cutaneous small-cell neuroendocrine (Merkel cell) carcinomas. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007 Oct;21(9):1220-8.
173. Diaz-Cano SJ. Kinetic topographical heterogeneity in follicular thyroid neoplasms and growth patterns. *Histopathology.* 2007 Sep;51(3):416-8.
174. Soussi T. p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* 2007;26:2145-56.
175. Levina E, Oren M, Ben-Ze'ev A. Downregulation of β -catenin by p53 involves changes in the rate of β -catenin phosphorylation and Axin dynamics. *Oncogene* 2004;23:4444-53.
176. Sadot E, Geiger B, Oren M. A. Downregulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6768–6781.

177. Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, et al. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 β and p53 after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002;99(12): 7951–7955.
178. Liu J, Stevens J, [Rote CA](#), et al. Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell.* 2001;7(5):927-36.
179. [Matsuzawa SI](#), [Reed JC](#). Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell.* 2001;7(5):915-26.
180. [Sadot E](#), [Geiger B](#), [Oren M](#), et al. Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol.* 2001;21(20):6768-81.
181. Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S. Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* 2000; 31: 1506-14.
182. Valentini AM, Renna L, Armentano R, et al. Mismatch repair, p53 and beta-catenin proteins in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2002; 22: 2083-88.
183. Sadot E, Geiger B, Oren M, et al. Down-regulation of β -catenin by activated p53. *Mol Cell Biol* 2001;20:6768-81.
184. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B. Mutational analysis of the APC/b-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1130–1134.
185. Valentini AM, Pirrelli M, Renna L, et al. P53 and Beta-Catenin in Colorectal Cancer Progression. *Current Pharmaceutical Design* 2003; 9: 1932 – 1936.
186. Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, et al. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 82(10): 1689-1693.
187. Smith G, Carey FA, Beattie J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9433-38.
188. Hanski C, Hofmeier M, Schmitt-Graff, A. et al. Overexpression or ectopic expression of MUC2 is the common property of mucinous carcinomas of the colon, pancreas, breast, and ovary. *J Pathol* 1997; 18: 385–391
189. Nozoe T, Anai H., Nasu S, et al. Clinicopathological characteristics of mucinous carcinoma of the colon and rectum. *J. Surg. Oncol.* 2000; 75; 103–107.
190. Bocker E, Cuesta KH, Curkholder S. Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic marckers. *Hum Pathol.* 2000; 31: 1506 – 1514.
191. Gologan A, Sepulveda AR. Microsatellite instability and DNA mismatch repair deficiency testing in hereditary and sporadic gastrointestinal cancers. *Clin Lab Med* 2005;25:179–196

192. Blanes A, Sanchez-Carrillo JJ, Diaz-Cano SJ. Topographic molecular profile of pheochromocytomas: role of somatic down-regulation of mismatch repair. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(3):1150-8.
193. Jimenez JJ, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Microsatellite instability in colon cancer. *N Engl J Med* 2003 Oct 30;349(18):1774-6.
194. Rubio J, Blanes A, Sanchez-Carrillo JJ, Diaz-Cano SJ. Microsatellite abnormalities and somatic down-regulation of mismatch repair characterize nodular-trabecular muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Histopathology*. 2007;51(4):458-67.
195. Blanes A, Rubio J, Sanchez-Carrillo JJ, Diaz-Cano SJ. Coexistent intraurothelial carcinoma and muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: clonality and somatic down-regulation of DNA mismatch repair. *Hum Pathol* 2009;40(7):988-97.
196. Blanes A, Rubio J, Martinez A, Wolfe HJ, Diaz-Cano SJ. Kinetic profiles by topographic compartments in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder: role of TP53 and NF1 genes. *Am J Clin Pathol*. 2002 Jul;118(1):93-100.
197. Zlobec I, Baker K, Terracciano LM, Lugli A. RHAMM, p21 combined phenotype identifies microsatellite instability-high colorectal cancers with a highly adverse prognosis. *Clin Cancer Res* 2008;14:3798-806.
198. Boland CR. Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis. *Int J Cancer* 1999; 55: 2304-9.
199. Rigau V, Sebbagh N, Olschwang S. Microsatellite instability in colorectal cancer: Comparison of immunohistochemistry and molecular biology in a series of 212 cases. *Virchows Arch*. 2001;439:061
200. Blanes A, Diaz-Cano SJ. Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. *World J Gastroenterol* 2006 7;12(37):5932-40.
201. Monzon F, Kovatich A, Barusevicius A, et al. Effect of fixation time on the immunohistochemical detection of HMLH1 and HMSH2 in paraffin – embedded tissue. *Mod Pathol*. 1999;12:193.
202. Ortega P, Moran A, de Juan C, et al. Differential Wnt pathway gene expression and E-cadherin truncation in sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability. *Clin Cancer Res* 2008;14: 995-1001
203. Lugli A, Zlobec I, Minoo P, et al. Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, β -catenin and E-cadherin in colorectal cancer-a tissue microarray-based analysis. *Histopathology* 2007;50:453-64.
204. Zhang MG, Zong-Min EC, Wang HL. Immunohistochemical investigation of tumorigenic pathways in small intestinal adenocarcinoma: a comparison with colorectal Adenocarcinoma. *Modern Pathology*. 2006; 19: 573–580.

205. Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res* 1999;59:3346– 3351.
206. Miyaki M, Iijima T, Kimura J. Frequent mutation of betacatenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59:4506–4509.
207. Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, et al. Mutations in b-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error – positive tumors. *Cancer Res.* 1997; 57; 4478 – 81.
208. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann NY Acad Sci*, 2000; 910: 121-13.
209. Skacel [M](#), [Skilton B](#), [Pettay JD](#), et al. Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. [Appl Immunohistochem Mol Morphol](#). 2002;10(1):1-6.
210. Fernebro E, Dictor M, Bendahl PO, et al. [Evaluation of the tissue microarray technique for immunohistochemical analysis in rectal cancer](#). *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(6):702-5.
211. Su Y, Shrubsole MJ, Ness RM. Immunohistochemical Expressions of Ki-67, Cyclin D1, B-Catenin, Cyclooxygenase-2, and Epidermal Growth Factor Receptor in Human Colorectal Adenoma: A Validation Study of Tissue Microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(9):1719–26.
212. Zlobec I, Terracciano L, Jass JR, et al. Value of staining intensity in the interpretation of immunohistochemistry for tumor markers in colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2007; 451:763–769
213. Schwandner O, Schiedeck TH, Bruch HP, et al. p53 and Bcl-2 as significant predictors of recurrence and survival in rectal cancer. *Eur J Cancer*. 2000; 36:348–356.
214. Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, et al. Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 2004(9);22:1572-82.
215. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, et al. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 2004; 52:893–901.
216. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, et al. Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3069–3075
217. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 2005; 16:102–108.

218. Jourdan F, Sebbagh N, Comperat E, et al. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. [Virchows Arch](#). 2003;443(2):115-21.
219. Torhorst J, Bucher C, Kononen J. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*. 2001; 159:2249–2256.
220. Goethals L, Perneel C, Debucquoy A, et al. A new approach to the validation of tissue microarrays. *J Pathol*. 2006; 20: 607–614.